Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Producción científica en
CIENCIAS BIOLÓGICAS

Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Producción científica en CIENCIAS BIOLÓGICAS

Editora chefe
Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira
Editora executiva
Natalia Oliveira
Assistente editorial
Flávia Roberta Barão
Bibliotecária
Janaina Ramos
Projeto gráfico
Camila Alves de Cremo
Daphynny Pamplona
Gabriel Motomu Teshima
Luiza Alves Batista
Natália Sandrini de Azevedo
Imagens da capa
iStock
Edição de arte
Luiza Alves Batista

Producción científica en ciencias biológicas

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Mariane Aparecida Freitas
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Daniela Reis Joaquim de Freitas

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P964 Producción científica en ciencias biológicas / Organizadora Daniela Reis Joaquim de Freitas. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF
Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia
ISBN 978-65-258-0020-2
DOI: https://doi.org/10.22533/at.ed.202220504

1. Ciências biológicas. I. Freitas, Daniela Reis Joaquim de (Organizadora). II. Título.

CDD 570

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná – Brasil
Telefone: +55 (42) 3323-5493
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.

DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access, desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce,* ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.

APRESENTAÇÃO

Las Ciencias Biológicas estudian los seres vivos y todas sus relaciones entre sí y con el medio ambiente. Es un campo muy amplio, que engloba diferentes áreas de conocimiento, y que puede ser aplicado en el área de la educación, la investigación, la bioconservación ambiental, la salud, etc.

El trabajo “Producción ciencia en Ciencias Biológicas” está enfocado a discutir la formación del conocimiento en varias áreas que conforman el gran dominio de las Ciencias Biológicas, brindando al lector una visión variada y amplia de lo que se produce en esta área en la actualidad. En este trabajo contamos con seis capítulos compuestos por artículos científicos originales basados en trabajos de investigación.

Los trabajos descritos en este libro abordan temas relacionados con las ciencias de la salud como microbiología, zoología y ecología de especies, botánica, divulgación científica, medio ambiente, biodiversidad y bioconservación. Esta multidisciplinariedad es de gran importancia, ya que la investigación con diferentes perspectivas profesionales tiende a proporcionar una visión más amplia y una mayor aplicabilidad en la vida cotidiana del lector.

Creemos que este trabajo enriquecerá su conocimiento y demostrará que la ciencia puede ser muy placentera. Atena Editora, buscando la calidad, tiene a su disposición un cuerpo editorial compuesto por maestros y doctores formados en las mejores universidades de Brasil, para la revisión de sus obras. Por lo tanto, está asegurado que tiene un trabajo de excelente calidad en sus manos. Esperamos que disfrute de su lectura. ¡Buenos estudios!

Daniela Reis Joaquim de Freitas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

EFEITO ANTIBACTERIANO DE EXTRATOS HEXANO, CLOROFÓRMICO E METANÓLICO DE FOLHAS DE *Prosopis juliflora* SOBRE BACTÉRIAS NOSOCOMIAIS

Data de aceite: 01/02/2022

Aurora Martínez Romero
Doctora en Ciencias Agropecuarias por la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio
Durango, México

José Luis Ortega Sánchez
Doctor en Educación por la Universidad Autónoma de Coahuila
Institución: Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas
Bermejillo, Durango

Luis Otoniel García Contreras
Maestro en Bioquímica Clínica por la Universidad Juárez del Estado de Durango
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Gómez Palacio
Durango, México

Maribel Cervantes-Flores
Doctora en Inmunología por la Universidad Nacional Autónoma de México
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Unidad Durango
Durango, México

José de Jesús Alba-Romero
Doctor en Ciencias Biomédicas por la Universidad Juárez del Estado de Durango
Institución: Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Gómez Palacio
Durango, México

EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, CLOROFÓRMICO Y METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Prosopis juliflora* EN BACTERIAS NOSOCOMIALES

RESUMEN: Evaluar el efecto antibacteriano en bacterias nosocomiales de los extractos clorofórmico, metanólico y hexánico de las hojas del *Prosopis juliflora* (mezquite). En el extracto de *Prosopis juliflora* se identificaron esteroles y triterpenos, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides. El efecto antibacteriano fue mediante el método modificado de pozos en agar; se empleó *S. aureus* ATCC 13071 y *E. coli* ATCC 25992. Se trabajó con concentraciones de alcaloides totales de 2.5 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL disueltos en DMSO y cloranfenicol como control. Con el extracto clorofórmico los halos de inhibición en promedio frente a *S. aureus* fueron de 14.6 mm de diámetro a la concentración de 2.5 mg/mL, 17 mm de diámetro a 5 mg/mL y 19.4 mm de diámetro a una concentración de 10 mg/mL; para *E. coli* los halos de inhibición fueron de 13 mm de diámetro a una concentración de 2.5 mg/mL, 15.1 mm de diámetro a 5 mg/mL y 16.4 mm de diámetro para la concentración de 10 mg/mL. En cuanto al extracto metanólico de hojas secas de *Prosopis juliflora* los halos de inhibición en

promedio frente a *S. aureus* fueron de 14.6 mm de diámetro a la concentración de 2.5 mg/mL, 17 mm de diámetro a 5 mg/mL y 19.4 mm de diámetro a una concentración de 10 mg/mL; para *E. coli* los halos de inhibición fueron de 13 mm de diámetro a una concentración de 2.5 mg/mL, 15.1 mm de diámetro a 5 mg/mL y 16.4 mm de diámetro para la concentración de 10 mg/mL. En conclusión, los alcaloides totales extraídos de hojas secas de *Prosopis juliflora* en extracto clorofórmico y etanólico a las concentraciones de 2.5 mg/mL, 5 mg/mL y 10 mg/mL presentan efecto antibacteriano *in vitro* frente a las bacterias nosocomiales *S. aureus* y *E. coli*.
PALABRAS CLAVE: *Escherichia coli,* diagnóstico, Mezquite, *Staphylococcus aureus.*

ANTIBACTERIAL EFFECT OF THE HEXANE, CHLOROFORM, AND METHANOLIC EXTRACTS OF LEAVES OF *Prosopis juliflora* ON NOSOCOMIAL BACTERIA

ABSTRACT: To evaluate the antibacterial effect on nosocomial bacteria of the chloroformic, methanolic and hexanic extracts of the leaves of *Prosopis juliflora* (mesquite). Sterols and triterpenes were identified in the extract of *Prosopis juliflora*, coumarins, alkaloids, tannins, carbohydrates and flavonoids. The antibacterial effect was through the modified agar well method; *S. aureus* ATCC 13071 and *E. coli* ATCC 25992 were used. Total alkaloid concentrations of 2.5 mg/mL, 5 mg/mL and 10 mg/mL dissolved in DMSO and chloramphenicol were used as control. With the chloroform extract the inhibition halos on average against *S. aureus* were 14.6 mm in diameter at a concentration of 2.5 mg/mL, 17 mm in diameter at 5 mg/mL and 19.4 mm in diameter at a concentration 10 mg/mL; for *E. coli* the inhibition halos test was 13 mm in diameter at a concentration of 2.5 mg/mL, 15.1 mm in diameter at 5 mg/mL, and 16.4 mm in diameter at a concentration of 10 mg/mL. Regarding the methanolic extract of dry leaves of *Prosopis juliflora*, the inhibition halos test on average against *S. aureus* were 14.6 mm in diameter at a concentration of 2.5 mg/mL, 17 mm in diameter at 5 mg/mL, and 19.4 mm in diameter. diameter at a concentration of 10 mg/mL; for *E. coli* the inhibition halos test was 13 mm in diameter at a concentration of 2.5 mg/mL, 15.1 mm in diameter at 5 mg/mL, and 16.4 mm in diameter at a concentration of 10 mg/mL. In conclusion, the total alkaloids extracted from dried leaves of *Prosopis juliflora* in chloroform and ethanolic extract at concentrations of 2.5 mg/mL, 5 mg/mL and 10 mg/mL show an antibacterial effect in vitro against nosocomial bacteria *S. aureus* and *E. coli*.
KEYWORDS: *Escherichia coli,* diagnosis, Mesquite, *Staphylococcus aureus.*

INTRODUCCIÓN

Las infecciones nosocomiales (IN) van vinculadas con el progreso médico, procesos diagnósticos y terapéuticos (Colmenero *et al.* 2008). Consideradas también como la infección que ocurre 48 horas después de que el paciente ingresa al hospital, es decir, que no estuvo presente en periodo de incubación en el momento de la admisión hospitalaria, o aquella infección que comenzó entre las 72 horas después del egreso hospitalario del paciente (López-Herrera *et al.* 2012). Las IN ocasionan una elevada mortalidad, prolongan la estancia hospitalaria y aumentan los costos asistenciales (Pujol *et al.* 2013). Estas

infecciones agravan la discapacidad funcional del paciente y, en algunos casos, pueden ocasionar trastornos discapacitantes que reducen la calidad de vida (OMS, 2002).

En general, estas infecciones están relacionadas con procedimientos asistenciales invasivos: la infección urinaria nosocomial con el cateterismo urinario, infección quirúrgica con el procedimiento quirúrgico, infección respiratoria con la ventilación mecánica invasiva y bacteriemia de catéter con el cateterismo vascular (Pujol *et al.* 2013). La infección que se detecta con mayor frecuencia en los pacientes es la neumonía, seguida de infección de vías urinarias (SSA, 2011). La máxima prevalencia ocurre en unidades de cuidados intensivos, en pabellones quirúrgicos y ortopédicos de atención a enfermedades agudas. La tasa de prevalencia de IN es mayor en pacientes vulnerables por edad avanzada, enfermedad subyacente o quimioterapia (OMS, 2002).

Actualmente, una de las principales amenazas para la salud pública mundial son las infecciones del tracto respiratorio, causadas por *Escherichia coli* (*E. coli*)*, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)*, Klebsiella pneumoniae*. Debido a la farmacorresistencia de las bacterias, se recurre a la medicina tradicional. Las investigaciones demuestran que los extractos del mezquite (*P. juliflora*) inhiben el crecimiento microbiano.

S. aureus es un microorganismo colonizante fácilmente transmisible de la piel y la mucosa. Las primeras cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) aparecieron en la década de los 60's. A medida que el SARM se propagaba de un hospital a otro, se convirtió cada vez más en una fuente de IN (Barrufet *et al.* 2014). Incluso se documenta que SARM es uno de los principales microorganismos que causan infecciones en los hospitales, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (Arias-Ortiz *et al.* 2016).

Además de las infecciones crónicas, *S. aureus* puede causar enfermedades por aspiración, muchas de las cuales se caracterizan por la capacidad de este patógeno para producir estructuras de superficie que facilitan la colonización intensiva y/o toxinas extracelulares (Lázaro-Díez *et al.* 2016). La resistencia a agentes antimicrobianos es un gran problema debido a que se tienen que emplear medicamentos más fuertes y con mayor impacto en la salud humana. Entre los patógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR) se encuentra *E. coli* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) es a menudo responsable del fracaso terapéutico y de un programa de control de la infección pobre que conduce a un aumento de morbimortalidad en humanos (Kar *et al.* 2016).

El aumento de la resistencia de los microorganismos a los fármacos antimicrobianos es un problema mundial de salud pública creciente, particularmente entre los microorganismos que causan IN (Aguadero 2015). Son conocidas la frecuencia y gravedad de las IN por *S. aureus*, y aquéllas originadas en SARM constituyen un desafío terapéutico. Éstas aparecían casi uniformemente en pacientes hospitalizados, pero actualmente se ven con frecuencia en infecciones adquiridas en la comunidad con una inusitada gravedad (López 2014). El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias MDR que son especialmente peligrosas en

hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones del torrente sanguíneo y neumonías (OMS, 2017).

Las IN relacionadas con la atención médica son el evento secundario más frecuente durante el internamiento de un paciente (SSA 2015). La etiología de las IN consiste en gérmenes que colonizan e invaden el organismo del paciente por diferentes vías. Una de las más frecuentes son las del tracto respiratorio por *S. aureus,* MRSA, *E. coli*. El deterioro del sistema inmunológico y la disminución de las defensas naturales del organismo facilitan el inicio de una IN.

En la actualidad, las plantas siguen siendo fuente importante de prototipos de antimicrobianos debido a la gran variedad y complejidad en su composición. Los antibióticos que originalmente se desarrollaron a partir de productos naturales, han revolucionado el tratamiento de infecciones; sin embargo, con la aparición y diseminación de microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos, se ha incrementado la necesidad de buscar nuevos agentes quimioterapéuticos efectivos. Son numerosas las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales, pero aún falta realizar estudios dirigidos hacia la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales.

El mezquite es un recurso biótico con amplia distribución geográfica y ecológica en las zonas áridas mexicanas, fuente de alimento, forraje, material de construcción, combustible, refugio de fauna silvestre, fuente de néctar para abejas y otros insectos, es importante también en la retención del suelo y uso en medicina tradicional. Por lo que, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano en bacterias nosocomiales de los extractos clorofórmico, metanólico y hexánico de las hojas del *Prosopis juliflora* (mezquite).

MATERIAL Y MÉTODOS

El tipo de estudio fue transversal, analítico y observacional. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas Unidad Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED). La muestra fue material vegetal, las hojas de *P. juliflora* se recolectaron en el Ejido San Ignacio del Estado de Durango Km 42 que posteriormente fueron identificadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UJED. Se utilizaron cepas de *S. aureus* y de *E. coli*, aislados nosocomiales de pacientes de nosocomios. Las cepas fueron conservadas en tubos de rosca con agar Mueller Hinton (Difco®) a 4°C. Para su activación se tomó una asada del medio de reserva y posteriormente, se sembró en 5 mL de caldo Mueller Hinton. Los tubos se incubaron 24 h

a 37°C. Las cepas se conservaron en alícuotas de 0.5 mL de caldo Mueller Hinton a -20°C utilizando glicerol como crioprotector.

Ensayos biológicos. Obtención de extractos

Microplacas estériles fondo redondo con tapa de 96 pocillos (Corning Costar®), tubos con rosca de 13X100 (Pyrex®), puntillas amarillas, azules de 100 μl y 200 μl, respectivamente, medio Müeller Hinton (BD®).

Extracto hexánico

Las hojas secas y molidas (300g) se dividieron en tres partes para utilizar un total de 100 g que se procesaron primero con hexano (300 mL) por 24 h a temperatura ambiente (TA), posteriormente, se filtraron con papel Whatman No. 1, se destilaron y concentraron en rotavapor. Una vez seco se resuspendió en 15 mL de hexano.

Extracto clorofórmico

Para la obtención del extracto clorofórmico se tomaron 100 g que se procesaron con cloroformo (300 mL) por 24 h a TA, posteriormente, se filtraron con Whatman No. 1, se destilaron y se concentraron en rotavapor. Una vez seco se resuspendió en 15 mL de cloroformo.

Extracto metanólico

Para la obtención del extracto metanólico se tomaron 100 g que se procesaron con metanol absoluto (300 mL) por 24 h a TA, posteriormente, se filtraron con Whatman No. 1, se destilaron y se concentraron en rotavapor. Una vez seco se resuspendió en 15 mL de metanol, los concentrados se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Evaluación del Rendimiento de los extractos

Para la obtención del rendimiento de cada uno de los extractos, se consideró el peso de material vegetal en seco antes de la extracción (PI) y el peso del material seco logrado después de la extracción (PE), aplicado en la siguiente ecuación: **Rendimiento = PI – PE**

Pruebas bioquímicas de identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios

Para la determinación inicial de los compuestos presentes en los extractos se realizaron pruebas químicas de identificación. Las soluciones utilizadas fueron de 10 mg/mL de los extractos disueltos en metanol, cloroformo y hexano. Se utilizaron crisoles de

cerámica. Las insaturaciones se determinaron por la prueba del $KMnO_4$, es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café. Los oxidrilos fenólicos (taninos vegetales), se identificaron por la prueba de $FeCl_3$, es positiva si se observa un precipitado rojo, azul violeta o verde. Los esteroles y triterpenos se determinaron por la prueba de Liebermann-Burchard, es positiva por la formación de colores azul, verde, rojo, naranja. Los carbohidratos se identificaron por la prueba de Molish, es positiva si se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura. La reacción de Molish presenta la propiedad de teñir cualquier carbohidrato presente en una disolución.

Las quinonas se identificaron con la prueba de Bornträger en donde es positiva, si al final de la reacción con KOH, la fase de benceno se decolora y la alcalina se torna roja. Las cumarinas se identifican con la prueba de las cumarinas, es positiva si aparece una coloración amarilla. Para detectar el anillo lactónico en relación a las cumarinas, se hace por la reacción de precipitación y coloración con NaOH. La identificación de ácido carboxílico se hizo por su reacción con $NaHCO_3$, observando el desprendimiento de gas carbónico. La determinación de sesquiterpenlactonas se realizó con la prueba de Baljet, el reactivo se prepara mezclando 1 g de ácido pícrico en etanol al 95% a 10 g de NaOH en 100 mL de agua. Se añaden unas gotas del reactivo a la muestra, una coloración roja clara (color naranja) a roja oscura indica prueba positiva.

Para detectar la presencia de los flavonoides se realizó la prueba de Shinoda que es positiva si se presentan colores naranja, rojo, azul y violeta. La presencia de alcaloides se realizó por la prueba de Dragendorff. Se revela una placa cromatografía con este reactivo y aparece una coloración rojo o naranja. La presencia de saponinas se determina por la prueba de agitación, es positiva si hay formación de espuma con apariencia de panal de abeja, así como por la prueba del $NaHCO_3$, es positiva si hay aparición de burbujas por más de un minuto.

Preparación de muestras para actividad antibacteriana

Las soluciones stock para la actividad antibacteriana se prepararon disolviendo 1.0, 2.5; 5.0 y 10.0 mg/mL de las muestras a evaluar en 5% de DMSO en el medio líquido correspondiente hasta alcanzar una concentración de 20 mg/mL. Las soluciones stock se mantuvieron a -20°C hasta antes de su uso. Las soluciones de trabajo para la actividad antibacteriana se prepararon tomando una alícuota de la solución stock y diluyéndola con medio Müeller Hinton (BD®).

Material biológico. Cepas bacterianas y preparación del inóculo

Para la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes cepas de referencia: Bacterias GN: *E. coli* ATCC 25992, y Bacterias GP: *S. aureus* ATCC 13071. Bacterias de

aislados clínicos de *E. coli* (n=6), *S. aureus* (n=6). Se aislaron colonias de la especie *E. coli* y se consideraron como colonias de esta especie aquellas que presentaron una coloración azul oscuro o violeta en el medio agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y en agar Mc Conkey (MCK).

Identificación bacteriana

Se realizó a través de los sistemas API20E (bioMérieux) inoculando de acuerdo a las especificidades del fabricante y el sistema automatizado VITEK® (bioMérioux), empleando tarjetas Gram Negative Identification (GNI). En el caso del sistema API la lectura de las tiras se realizó de forma manual y su interpretación se realizó empleando el sofware apiweb, 2006.

Sensibilidad antimicrobiana

En los estudios de sensibilidad se empleó el sistema VITEK 2 compact (bioMérioux) y se usaron las tarjetas para identificación de bacterias GN y GP. Se tomó una asada de cultivo fresco que se resuspendió en 1.8 mL de SS estéril (0.45%) para obtener una concentración correspondiente al tubo 1 en la escala de Mac Farland, para esto se utilizó un nefelómetro. Se hidrataron los pozos con 100 μl de la suspensión del microorganismo equivalente a $1x10^6$ UFC/mL/37°C. Para preparar el inoculo para el ensayo, se transfirieron de tres a cinco colonias de cada cultivo a tubos con SS estéril, y la turbidez se ajustó con el estándar 0.5 de McFarland (1.5 $X10^8$ UFC/mL). Posteriormente, se transfirieron 10 μL en 11 mL de caldo Müeller Hinton, para alcanzar 5 x 10^5 UFC/mL.

Ensayo biológico

Las evaluaciones antimicrobianas de los extractos obtenidos con el solvente polar (metanol) y para el caso de los extractos obtenidos con solventes no polares (hexano y cloroformo) se utilizó la técnica de difusión con discos de papel filtro, los cuales fueron impregnados con 50 μl de los extractos, se mantuvo a TA/15 min para evaporar el solvente y, posteriormente, se colocaron sobre el agar Mueller Hinton en los cuales fueron previamente inoculados con las cepas de referencia y las cepas de aislamientos clínicos de *S. aureus* y *E. coli*.

RESULTADOS

De 100 g de material vegetal que se obtuvo triturado con el extracto hexánico se logró tener un rendimiento del 3%; *P. juliflora* en el extracto clorofórmico se obtuvo un rendimiento del 3.5% y con el extracto metanólico se obtuvieron 14 g, resultando un rendimiento del 14%. Respecto a los resultados de las pruebas bioquímicas de identificación

de grupos funcionales y metabolitos en los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *P. juliflora*, se observó la presencia de esteroles y triterpenos, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides (**Tabla 1**).

Prueba de identificación de compuestos químicos	Extracto clorofórmico	Extracto metanólico	Extracto hexánico
$KMNO_4$ (Dobles enlaces)	-	-	-
Liebermann-Burchard (Esteroles y Triterpenos)	+	+	-
NaOH (Cumarinas)	+	+	+
Dragendorff (Alcaloides)	+	+	-
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	-	-	-
Bornträger (Quinonas)	-	-	-
$NaHCO_3$ (Grupo Carboxilo)	-	-	-
$FeCl_3$ (Taninos)	+	+	-
Espuma (Saponinas)	-	-	-
Molish (Carbohidratos)	+	+	-
Shinoda (Flavonoides)	+	+	+

Tabla 1. Identificación de grupos funcionales y metabolitos de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de *Prosopis juliflora*.

En cuanto a la evaluación de la sensibilidad a diferentes antibióticos en contra de microorganismos nosocomiales, *S. aureus* presentó resistencia a 2 de 18 antibióticos presentes en Tarjetas AST-GP61, como se observa en la **Tabla 2**.

Antibiótico	*Resultado
Ampicilina	R
Ampicilina sulbactam	I
Bencilpenicilina	R
Cefazolina	I
Cloranfenicol	S
Clindamicina	I
Eritromicina	I
Galifloxacina	I
Gentamicina	S
Levofloxacina	I
Linezolida	S
Moxifloxacina	I
Nitrofurantoína	S
Oxacilina	I

Quinupristina/dalfopristina	**S**
Rifampicina	**S**
Tetraciclina	**S**
Vancomicina	**S**

Tabla 2. Sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, en relación con las Tarjetas Vitek®2.

*R=Resistente.

*S=Sensible.

*I =Intermedio.

En lo concerniente a la evaluación de la sensibilidad a diferentes antibióticos en contra de microorganismos nosocomiales, *E. coli* presentó resistencia a 11 de 18 antibióticos presentes en Tarjetas AST-GN05, como se observa en la **Tabla 3**.

Antibiótico	***Resultado**
Amoxicilina/clavulánico	**I**
Ampicilina	**R**
Cefalotina	**R**
Cefazolina	**R**
Cefoxitin	**I**
Cefpodoxima	**I**
Ceftazidima	**I**
Cefuroxima	**R**
Ciprofloxacina	**R**
Gentamicina	**R**
Levofloxacina	**R**
Ácido nalidíxico	**R**
Nitrofurantoína	**S**
Norfloxacina	**R**
Tetraciclina	**R**
Ticarcilina	**R**
Ticarcilina/clavulánico	**I**
Tobramicina	**I**
Sulfametoxazol/Trimetoprim	**I**

Tabla 3. Sensibilidad antimicrobiana de *E. coli*, en relación con las Tarjetas Vitek®2.

*R=Resistente; *S=Sensible; *I =Intermedio.

Las bacterias nosocomiales aisladas para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de las hojas de *P. juliflora* fueron las que se pueden observar de la **Figura 1** a la **5**.

Figura 1. Desarrollo de cepas bacteriológicas de *S. aureus* en agar Sal y Manitol.

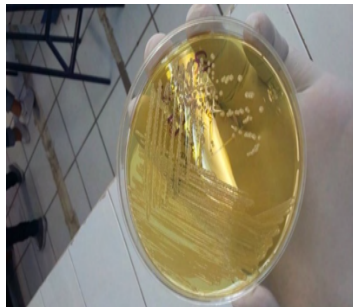



Figura 2. Colonias Aisladas por Agotamiento de S. *aureus.*

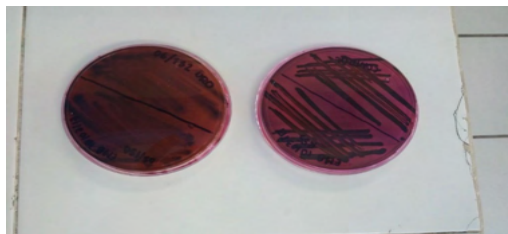



Figura 3. Crecimiento Bacteriano de *E. coli.*

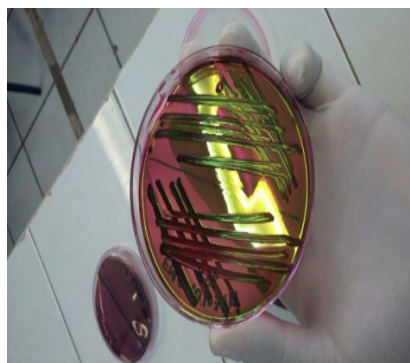



Figura 4. Verde metálico brillante de las especies *E. coli* en agar EMB.

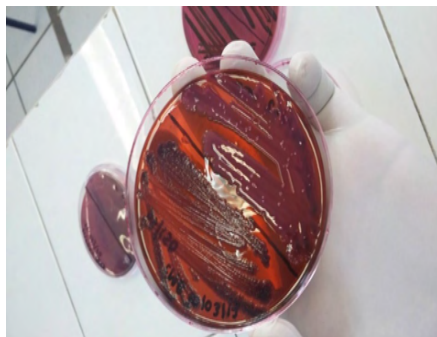



Figura 5. Crecimiento de la Cepa *E. coli* en agar MCK.

En lo que respecta al resultado de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de *P. juliflora* el rango del halo de inhibición, solo se observó inhibición con el extracto etanólico con un promedio de 2.5±0.1 cm de diámetro. El extracto clorofórmico y metanólico mostraron actividad en contra de *E. coli* (125 µg/mL) y contra *S. aureus* (125 µg/mL). Con el extracto clorofórmico de *P. juliflora* los halos de inhibición en promedio frente a *S. aureus* fueron de 14.6 mm de diámetro a la concentración de 2.5 mg/mL, 17 mm de diámetro a 5 mg/mL y 19.4 mm de diámetro a 10 mg/mL; para *E. coli* los halos de inhibición fueron de 13 mm de diámetro a una concentración de 2.5 mg/mL, 15.1 mm de diámetro a 5 mg/mL y 16.4 mm de diámetro para 10 mg/mL. En cuanto al extracto metanólico de hojas secas de *P. juliflora* los halos de inhibición en promedio frente a *S. aureus* fueron de 14.6 mm de diámetro a la concentración de 2.5 mg/mL, 17 mm de diámetro a 5 mg/mL y 19.4 mm de diámetro a 10 mg/mL; para *E. coli* los halos de inhibición fueron de 13 mm de diámetro a una concentración de 2.5 mg/mL, 15.1 mm de diámetro a 5 mg/mL y 16.4 mm de diámetro para la concentración de 10 mg/mL. Con el extracto hexanoico de *P. juliflora* y con *E. coli* y *S. aureus* no se formaron halos de inhibición.

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano en bacterias nosocomiales de los extractos clorofórmico, metanólico y hexánico de las hojas del *P. juliflora* (mezquite). En las determinaciones químicas del extracto de *P. juliflora* se identificaron esteroles y triterpenos, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides. En otra investigación se realizó la evaluación del extracto de *P. laevigata* en donde se demostró la presencia de esteroles, cumarinas, alcaloides, taninos, carbohidratos y flavonoides, *Prosopis* spp es un árbol que fija el N_2, alcanzando alturas entre 5 a10 m de alto, y hay alrededor de 44 especies diferentes en el mundo, y 10 de ellas en México (Jenkins *et al.* 1987). Al respecto, se documenta que en las hojas de *P. juliflora* se encuentran los alcaloides julifloridina y juliprosopina, el indol-alcaloide triptamina, y el sesquiterpeno

prosopidiona. De la corteza del tallo se han aislado los flavonoides 8-hidroxi-4'-metoxi-7-neohesperidósido de iso-flavona, 4 metil-éter-beta-galactopiranósido de camferol, alfa-ramnósido de leucodelfinidín y el glucosil-ramnósido y ombuín. Del fruto se han aislado los flavonoides camferol, glucopiranósido de leucocianidín y glucopiranosil-ramnopiranósido de delfinidín; y la cumarina pentaglicósilada del ácido dimetil-elágico. En la raíz se han detectado los flavonoides galactopiranósidos de 3'-4'-dihidroxo-5-metoxi-6-metil-flavonona y 4-7-dimetoxi-6-8-metil-flavonona. En la planta se han detectado los alcaloides indolizidina juliprosina y el iso-componente. En la semilla la cumarina 4-ramnosilgentiobiósido del ácido elágico (Singh, 2012).

Valenzuela-Balderas y colaboradores (2017) obtuvieron los extractos acuosos y metanólicos elaborados a partir de hoja, flor y vaina de la especie *P. glandulosa*, se determinó la composición química proximal de la vaina del mezquite la cual incluye proteína cruda (7.84), fibra cruda (43.82), lípidos crudos (3.49), ceniza (6.25) y carbohidratos (34.28); el extracto metanólico se preparó a partir de harina de semillas, hoja, vaina y carozo, el extracto acuoso por decocción de harina de hoja, flor y vaina; dichos extractos arrojaron resultados positivos, presentando mayor inhibición el extracto metanólico con *Salmonella* spp y *Salmonella thypimurium*, en las GN; el extracto acuoso mostro mayor inhibición en las GP: *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecium*.

En el presente trabajo la sensibilidad para cepas intrahospitalarias de *E. coli* estuvo representada por nitrofurantoína y para *S. aureus* cloranfenicol, gentamicina, linezolida, nitrofurantoína, quinupristina/dalfopristina, rifampicina, tetraciclina y vancomicina. La resistencia para *E. coli* estuvo representada por ampicilina, cefalotina cefazolina, cefuroxima, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, tetraciclina ticarcilina. La resistencia para *S. aureus* representada por ampicilina y bencilpenicilina.

Al respecto Llor y colaboradores (2018) obtuvieron que la prevalencia de SARM fue del 1,3% (IC 95%: 0,5-2,1%), con porcentajes de resistencia frente a fenoximetilpenicilina del 87,1% y a azitromicina 11,6%, sin observar diferencias significativas según edad y sexo. Un 2,4% (IC 95%: 0,1-4,7%) de las cepas de neumococo fueron altamente resistentes a fenoximetilpenicilina y macrólidos, mientras que las mayores resistencias se observaron frente a cefaclor (53,3%), tetraciclina (20%) y cefuroxima (12,1%). Concluyeron que esos patógenos tienen resistencias más bajas en la comunidad que las que se observan en el medio hospitalario, a lo que propone se conozca la resistencia antibiótica actual para poder hacer uso prudente de antibióticos. También se encontró que en el grupo de los beta-lactámicos, la piperazilina/tazobactam mostró los mejores resultados de sensibilidad con cifras de 90% y en el grupo de los aminoglucósidos la amikacina, con igual porcentaje. Las beta-lactamasas tipo OXA fueron las más frecuentes en el medio comunitario, representaron el 46,1%, seguidas de las BLEE con 30,3%. En menor porcentaje se identificaron las beta-lactamasas resistentes a inhibidores (IRT) y las penicilinasas de alto nivel con 11,2% y 7,9%, respectivamente. En el ambiente intrahospitalario, el comportamiento de las OXA y

de las BLEE fue 41,2% (Suárez-Trueba *et al.* 2014).

Rodríguez-Avial y colaboradores (2013) comentan que *E. coli* es el principal uropatógeno, que la aparición de cepas productoras de BLEE, que con frecuencia presentan multirresistencia, deja pocas opciones terapéuticas, y es necesario realizar un seguimiento de su sensibilidad a lo largo del tiempo. Padecer una IN condiciona a que se prolongue la estancia hospitalaria del paciente, aumenta la posibilidad de una discapacidad a largo plazo, una mayor resistencia a los medicamentos contra las bacterias, aumenta los costos para el paciente, familia y sector salud y muertes innecesarias. El tratamiento depende del tipo de infección y microorganismo causal. Sin embargo, existen muchas medidas de prevención y control, una de ellas y la forma más sencilla es el lavado de manos de forma correcta tanto del personal de salud, familiares y personas que visiten al enfermo en su estadía hospitalaria (SSA 2015).

Bode y colaboradores (2010) sugieren que para reducir el riesgo de transmitir una infección por *S. aureus* asociada a una IN es útil el lavado de manos con jabón/clorhexidina, 5 mL de jabón de gluconato de clorhexidina 4%, restregar por 5 min para lavado rutinario y por 15 min para lavado quirúrgico, enjuagar y secar, la clorhexidina es una sustancia desinfectante de acción bactericida y fungicida, pertenece al grupo de las biguanidas y se encuentra en el listado de Medicamentos esenciales de la OMS, lista que contiene los medicamentos más importantes que se requieren en un sistema sanitario (Webster y Osborne 2015).

Tanto el extracto clorofórmico como el metanólico mostraron un amplio espectro antibacteriano, esto se debe a los compuestos de los extractos, como los flavonoides, coumarinas y alcaloides que poseen actividad antibacteriana. Por lo que, es importante separar y purificar los compuestos de los extractos, ya que pueden servir de base para nuevos principios activos de medicamentos. Los alcaloides totales extraídos de hojas secas de *P. juliflora* en extracto clorofórmico y etanólico a las concentraciones de 2.5; 5 y 10 mg/mL presentan efecto antibacteriano *in vitro* frente a *S. aureus* y *E. coli*. Es de vital importancia la búsqueda de alternativas para la prevención y tratamiento de las IN ocasionadas por microorganismos farmacorresistentes presentes en hospitales. Las plantas son una alternativa por producir gran variedad de moléculas con propiedades medicinales y terapéuticas, que han mostrado ser efectivos al inhibir el crecimiento, así como factores de virulencia en algunos microorganismos. Estos compuestos de origen natural, producirán menor resistencia por los microorganismos que la adquirida por los fármacos sintéticos.

REFERENCIAS

Aguadero V, González-Velasco C, Vindel A, González-Velasco M, Moreno JJM. (2015). An analysis of the association between genotype and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates, Esp Quimioter. 28(2):79-5.

Arias-Ortiz PM, Calderón L del P, Castillo JS, Moreno J, Leal AL, Cortés JA, Álvarez CA. (2016). Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: A multicenter matched case-control study. Biomédica 36(4):612-8.

Bode L, Kluytmans J, Wertheim H, Bogaers D, Vandenbroucke-Grauls C, Roosendaal R. (2010). Preventing surgical-site infections in nasal carriers of *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 362:9-17.

Colmenero M, Sánchez A. (2008). Estadística bacteriológica de las infecciones nosocomiales en el Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. Nueve años de seguimiento. Rev Esp Med-Quir.13(1):1-6.

Jenkins MB, Virginia RA, Jarrell WM. (1987). Rhizobial Ecology of the Woody Legume Mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran Desert. Am Soc Microbiol. 53:36-40.

Kar D, Bandyopadhyay S, Dimri U, Mondal DB, Nanda PK, Das AK, Bandyopadhyay S. (2016). Antibacterial effect of silver nanoparticles and capsaicin against MDR-ESBL producing *Escherichia coli*: An in vitro study. Asian Pac J Trop Med. 6(10):807-10.

Lázaro-Díez M, Remuzgo-Martínez S, Rodríguez-Mirones C, Acosta F, Icardo JM, Martínez-Martínez L, Ramos-Vivas J. (2016). Effects of Subinhibitory Concentrations of Ceftaroline on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Biofilms, PLoS ONE. 11(1):1-15.

Llor C, Boada A, Pons-Vigués, Grenzner E, Juvé R, Almeda J. (2018). Sensibilidad antibiótica de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* en personas portadoras nasales sanas en atención primaria en el área de Barcelona. Aten Primaria 50(1):44-2.

López N, Puig-Orgaz C, Notario R, Gambandé T, Luciano MI, Borda N. (2014). Portación nasal de *Staphylococcus aureus* metilcilino resistentes en poblaciones de la comunidad. Rev Med Rosario 80:59-2.

López-Herrera J, Méndez-Cano A, Bobadilla-Espinosa R, Zacate-Palacios J. (2012). Infecciones nosocomiales, mortalidad atribuible y sobre estancia hospitalaria. Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc. 20(2):85-90.

OMS (2002). Prevención de las infecciones nosocomiales. OMS. Guía práctica.

OMS (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Comunicado de Prensa. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/

Pujol M, Limón E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31(2): 108-13.

Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Hernández E, Picazo JJ. (2013). Aumento significativo de la resistencia a fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* productoras de b-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de urocultivos (2005-2009-2011). SEQ 26: 43-6.

Singh, S. (2012). Phytochemical analysis of different parts of *Prosopis juliflora*. Int J Curr Pharm Rev Res. 4(3).

SSA (2011). Medición de la prevalencia de Infecciones Nosocomiales en Hospitales Generales de las principales Instituciones Públicas de Salud. http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_IF.pdf.

SSA (2015). Infecciones Nosocomiales. Secretaría de Salud. https://www.gob.mx/salud/articulos/infecciones-nosocomiales.

Suárez-Trueba B, Milián-Samper Y, Espinosa-Rivera F, Hart-Casares M, Llanes-Rodríguez N, Martínez-Batista ML. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. Rev Cubana Med 53(1): 3-13.

Valenzuela-Balderas A, Pimentel-Zapata A, Gutiérrez-Reyes E, Ávila-Damián MA, Linaje-Treviño MS, Valencia-Castro CM, De la Fuente-Salcido NM. (2017). Actividad antibacteriana y capacidad antioxidante en diferentes extractos de *Prosopis glandulosa* de Coahuila, México. IDCyTA 2:142-7.

Webster J, Osborne S. (2015). Preoperative bathing or showering with skin antiseptics to prevent surgical site infection. Cochrane Database Syst Rev. 20(2):1-22.

CAPÍTULO 2

EXPANDIENDO EL CONOCIMIENTO BIOLÓGICO: LA IX SEMANA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA DE LA UNIVASF COMO UNA HERRAMIENTA INTERNACIONAL DE DIVULGACIÓN Y COOPERACIÓN CIENTÍFICA

Data de aceite: 01/02/2022

Vladimir de Sales Nunes
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Bruno Cezar Silva
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Programa de Pós-Graduação em Administração Pública
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Norma Cristina Araujo González
Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Paraguay.

Mávani Lima Santos
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Gabriel Luiz Celante da Silva
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Thalles Rocchel Bezerra Muniz
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Isabela Ferreira Leão
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Julia Mariah Galdino Barbosa
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Caio Carvalho Novais de Moraes
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Brunara Evely de Araújo Lima
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Programa de Mestrado em Agronomia
Petrolina – Pernambuco, Brasil

Benoit Jean Bernard Jahyny
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Ciências Biológicas
Petrolina – Pernambuco, Brasil

RESUMEN: La pandemia de COVID-19 forzó adaptaciones a un nuevo modelo de trabajo con el fin de evitar aglomeraciones y la dispersión del SARS-CoV-2, conocido popularmente como coronavirus. Brasil fue uno de los países más afectados por la pandemia, con profundos impactos tanto en el ámbito científico como educacional, razón por la cual las instituciones de Educación Superior en el país suspendieron sus actividades presenciales mientras no había vacunas disponibles. En ese escenario, la Universidad Federal del Valle de São Francisco (UNIVASF), en Brasil, suspendió en marzo de 2020 todas sus actividades presenciales. En dicha universidad, la carrera de Biología organiza, anualmente, un evento científico titulado Semana

Académica de Biología, o SABIOVASF. Su novena edición, ocurrida en 2021, fue diferente de sus predecesoras, organizada en formato virtual por cuenta del escenario pandémico. Por lo tanto, este manuscrito ofrece un informe de la experiencia obtenida en la IX SABIOVASF; los desafíos, la metodología utilizada, los resultados y las perspectivas. El evento ocurrió del 21 al 24 de agosto de 2021 y tuvo, por primera vez, una dimensión internacional, con ponentes y participantes de varios países. Además, el equipo organizador del evento tuvo, también por primera vez, participantes de otras nacionalidades (Paraguay y Guatemala). En comparación con sus ediciones anteriores, la IX SABIOVASF también tuvo la mayor cantidad de participantes registrados y trabajos recibidos a través de resúmenes sometidos en ocho diferentes áreas del conocimiento. El evento fue realizado en tres idiomas (Portugués, Español e Inglés), y todas las actividades fueron transmitidas a través de *YouTube*, por donde los participantes pudieron interactuar con los ponentes. Además de representar un éxito para la carrera de Biología de la UNIVASF, las conexiones con diversas instituciones e investigadores extranjeros permitió la consolidación de importantes oportunidades de intercambio de conocimientos, recursos y habilidades. Asimismo, el abordaje exitoso de la metodología adoptada servirá de orientación para los organizadores de futuras ediciones de este tradicional evento de la carrera de Biología de la UNIVASF.
PALABRAS CLAVE: COVID-19; actividades remotas; biología; eventos científicos.

ABSTRACT: The COVID-19 pandemic forced adaptations to a new work model in order to avoid crowding situations and the dispersion of SARS-CoV-2. Brazil was one of the countries most affected by the pandemic, with profound impacts in both the scientific and educational fields, which is why the country's Higher Education institutions suspended their face-to-face activities while there were no vaccines available. In this scenario, the Federal University of the São Francisco Valley (UNIVASF), in Brazil, suspended all its face-to-face activities in March 2020. At the university, the Biology course annually organizes a scientific Biology Week, the SABIOVASF. Its ninth edition, which took place in 2021, was different from its predecessors and organized in a virtual format on behalf of the pandemic scenario. For this reason, this manuscript offers a report on the experience obtained in the IX SABIOVASF; the challenges, the methodology used, the results and perspectives. The event took place from August 21 to 24, 2021 and had, for the first time, an international dimension, with components and participants from various countries. In addition, the organizing team of the event had, also for the first time, participants from other nationalities (Paraguay and Guatemala). Compared to its previous editions, the IX SABIOVASF also had the largest number of registered participants and papers received through abstracts submitted in different areas of knowledge. The event was held in three languages (Portuguese, Spanish and English), and all the activities were broadcast through YouTube, where the participants were able to interact with the participants. In addition to representing a success for the Biology degree at UNIVASF, the connections with different foreign institutions and researchers made it possible to consolidate important opportunities for the exchange of knowledge, resources and skills. Likewise, the successful approach to the adopted methodology will serve as a guide for the organizers of future editions of this traditional event of the Biology course at UNIVASF.
PALABRAS CLAVE: COVID-19; remote activities; biology; scientific events.

1 I INTRODUCCIÓN

El año 2020 trajo innumerables desafíos a todo el mundo. La pandemia de COVID-19, que empezó en Wuhan, China, se expandió por todo el planeta y los impactos sufridos, además de un número gigantesco de muertos por la enfermedad causada por el SARS-COV-2, conocido como coronavirus, incluyeron adaptaciones forzadas hacia un nuevo modelo de trabajo a fin de evitar aglomeraciones.

En enero de 2022, mientras este artículo era escrito, la Organización Mundial de Salud (OMS) había reportado 332.617.707 casos confirmados y 5.551.314 muertos, una cifra catastrófica que explica porqué las medidas restrictivas tuvieron que ser adoptadas (WHO, 2021). Sin embargo, todo ese proceso trajo algo que muchos en las generaciones actuales no habían presenciado antes, como olas de negacionismo, ataques a la Ciencia, e incluso el rechazo a vacunarse con base en todo tipo de teorías conspiratorias (OMER *et al.*, 2021).

Brasil fue uno de los países más afectados por la pandemia de COVID-19, e incluso hubo días en que el país registró más de 4.000 muertes diarias (WATANABE, 2021). Además, los muchos escándalos públicos involucrando a acciones e inacciones del gobierno federal que terminaron por sabotear la lucha contra el coronavirus y ocultar los datos reales del alcance del COVID-19 llevaron a que los principales medios de prensa del país se organizaran en un consorcio nacional a fin de reunir y transmitir informaciones confiables a cerca de la real situación de la enfermedad en Brasil (DELTAFOLHA, 2020). Ese mismo consorcio ha reportado, en la fecha en que se escribe este manuscrito, 622.251 muertes y más de 23 millones de casos confirmados, con grandes posibilidades de subnotificación (G1, 2022).

Así mismo, el ambiente científico fue también profundamente impactado, y mientras duraba la peor parte de la pandemia, cuando aún no había vacunas disponibles o cuando ellas todavía no habían llegado a las poblaciones de los países afectados, actividades laborales y académicas que antes eran esencialmente presenciales tuvieron que ser adaptadas para el modelo remoto utilizando las más diversas herramientas (CERIONI & ARANHA, 2020).

En Brasil, la Educación Superior es, en su mayor parte, constituida por universidades públicas, incluyendo a universidades federales y estaduales, siendo las primeras generalmente más reconocidas por su gran calidad de enseñanza, aunque haya universidades estaduales con notable rendimiento no solo a nivel nacional, sino también a nivel mundial (BBC, 2021).

En ese escenario, la Universidad Federal del Valle de São Francisco (UNIVASF), presente en los estados de Pernambuco, Bahia, y Piauí, en Brasil, siguiendo lo que ya habían hecho otras instituciones de Educación Superior en el país por recomendación de las autoridades nacionales y mundiales de salud, suspendió, por medio de la Resolución

Nº 018/2020 de su Consejo Universitario en marzo de 2020, todas las clases y actividades administrativas presenciales en la universidad a fin de evitar la propagación del coronavirus, enfermedades y muertes (UNIVASF, 2020). Actualmente, aunque ya existan vacunas disponibles para toda la población de estudiantes, la suspensión sigue, y el reciente surgimiento de la variante Ómicron del coronavirus ha lanzado una atmósfera de duda acerca del futuro y de si sería posible el regreso a actividades presenciales mientras sigan los casos y muertes por COVID-19 (CDC, 2021).

La UNIVASF es una joven universidad federal brasileña creada en 2002. Hoy la institución tiene 35 cursos de graduación y 45 programas de posgrado (UNIVASF, 2016). La carrera de Biología, a su vez, fue creada en 2010, y una de sus actividades permanentes es un evento científico anual propio del curso, denominado "Semana Académica de Biología de la UNIVASF", o SABIOVASF (UNIVASF, 2022).

Este evento es un congreso científico realizado durante una semana y organizado principalmente por alumnos, con la participación también de profesores e investigadores de la UNIVASF con bajo tutela del Decanato de Extensión (PROEX) de la universidad. Anualmente se abre en la universidad un llamado para registros de equipos que deseen organizar la edición del año de la SABIOVASF. Habiendo más de un registro, los equipos compiten a través de una elección que elige el tema y los alumnos que lo desarrollarán en el evento.

Hasta 2019 hubo ocho ediciones de la SABIOVASF, todas de dimensión local. Sin embargo, la novena edición, que debió haber ocurrido en 2020, terminó por mostrarse un desafío que resultó de todos los acontecimientos de la pandemia. De esa manera, todo el planeamiento, originalmente pensado de manera presencial, tuvo que ser adaptado a los medios digitales para que el evento no fuera cancelado.

De esa manera, considerando el escenario pandémico, las medidas de seguridad adoptadas para evitar el contagio, y las adecuaciones al ambiente digital, los autores de este manuscrito (parte de un equipo mayor que se encargó de organizar la novena edición de la IX SABIOVASF), aprovechando las oportunidades de expansión ofrecidas por los medios digitales, priorizados durante la pandemia, logró realizar, por primera vez, un evento de porte internacional y con la participación de instituciones de siete países y cuatro continentes en un hecho sin precedentes en la historia del evento.

Por lo tanto, este capítulo traerá un informe de la experiencia obtenida en la IX SABIOVASF: los principales desafíos, la metodología utilizada, los resultados obtenidos y las perspectivas con base en lo que se logró hacer.

2 I METODOLOGIA

2.1 Aspectos digitales e internacionalización

Como se dijo anteriormente, la novena edición de la SABIOVASF debió haber ocurrido en el año 2020. Sin embargo, la pandemia de COVID-19 afectó los planes del equipo organizador, que planeaba un evento presencial en la UNIVASF. De esa manera, el aprendizaje con actividades académicas en medio remoto, adquirido durante el primer año de la pandemia, terminó por la nueva e inédita proposición de organizar esta edición de forma completamente virtual, entre los días 21 a 24 de agosto de 2021 y con el tema: "Biodiversidad, Riqueza y Diversidad del Mundo Natural".

Así mismo, esa forma de organización permitió que se buscaran asociaciones con instituciones y personas de otras regiones de Brasil y del exterior. Así fue que el equipo organizador, a través da la internet, buscó y contactó a entidades de Biología de diversas partes que pudieran interesarse en trabajar conjuntamente en el evento. Esos contactos fueron hechos a fin de buscarse ponentes en diferentes áreas del conocimiento para la IX SABIOVASF.

Por lo tanto, se logró establecer conexiones con instituciones e investigadores de siete países y cuatro continentes, por ejemplo: La Asociación de Estudiantes de Biología del Paraguay (AEBP) de la Universidad Nacional de Asunción (UNA), la Organización de Estudiantes de Biología de Guatemala de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC Tricentenaria), la *Association for the Conservation of Threatened Parrots*, establecida en Alemania con un ponente de Sudáfrica, la *Indira Gandhi National Tribal University*, en India, y la Universidad Autónoma del Estado de México, además de ponentes de Francia y varios de Brasil.

Además, considerando las dimensiones internacionales del evento y las partes involucradas, todas las ponencias, comunicaciones y materiales en las redes sociales y en el sitio web del evento estuvieron disponibles en tres idiomas: Portugués, Español e Inglés.

2.2 Estructuración general del evento

El conjunto de actividades planeadas para la IX SABIOVASF fue compuesto de conferencias, mesas redondas, sesiones de presentación de trabajos sometidos (resúmenes), atracciones culturales y ceremonias de apertura y clausura. Excepto por las dos últimas, todas las otras actividades fueron ejecutadas en uno de los tres idiomas utilizados en el evento para garantizar el carácter internacional de la semana académica.

La lista de conferencias y mesas redondas presentadas puede ser vista en el Cuadro 1. Todas las mediaciones de las actividades fueron hechas en el idioma que se utilizó en el momento, sin traducción simultánea por falta de recursos humanos para tal hecho. Considerando que este es un evento organizado por alumnos, esta fue también una oportunidad para que ellos tuvieran contacto con investigadores del exterior y pudieran

practicar sus habilidades de comunicación en otros idiomas.

Las sesiones de presentación de resúmenes fueron divididas en tres días y conducidas en la plataforma *Google Meet*. Cada sesión duró dos horas, y cada una de ellas tuvo tres salas simultáneas en las que los trabajos fueron presentados por sus autores principales. Las salas recibieron nombres de personalidades con importancia para la Biología y la protección de la biodiversidad, como Alfred Wallace, Henry David Thoreau, y Chico Mendes. Cada participante registrado en la IX SABIOVASF pudo revisar hasta dos resúmenes simples evaluados por un equipo de revisores *ad hoc*.

Los revisores *ad hoc* fueron seleccionados a través de llamadas enviadas por correo electrónico a la comunidad académica de la UNIVASF y redes académicas externas utilizando las direcciones disponibles en el Directorio de Grupos de Investigación en Brasil, como descrito en el ítem 2.4 de esta sección. Después de seleccionados, los revisores recibieron resúmenes de su área temática especifica sin identificación de los autores, para evitar conflictos de interés y parcialidad.

En total hubo 8 áreas temáticas para la sumisión de resúmenes simples: Botánica, Ecología y Biogeografía, Etnobiología, Genética, Inmunología, Parasitología y Salud, Microbiología, Zoología, y Limnología y Gestión Ambiental.

2.3 Equipos organizadores

Además de las relaciones en ponencias, colaboradores extranjeros fueron parte, por primera vez en la historia de la SABIOVASF, del equipo organizador. Sobre ese aspecto, el equipo principal que coordinó el evento fue compuesto de siete personas, seis de los cuales eran alumnos de la carrera de Biología de UNIVASF, y un docente del mismo curso. Cinco de los seis alumnos coordinaron, cada uno, una comisión organizadora con un tema específico, mientras dos ejercieron la presidencia y vicepresidencia del equipo organizador.

Las cinco comisiones pudieron tener tantos participantes como requerían, en su mayor parte alumnos de la carrera de Biología de UNIVASF. Esas comisiones fueron: Comisión Científica (la principal, responsable de buscar ponentes e intermediar los contactos por correo electrónico, además de buscar revisores *ad hoc*, estructurar y organizar la sumisión de trabajos, intermediar las ponencias y preparar los anales del evento), con 20 miembros, incluso colaboradoras de Paraguay y Guatemala; Comisión Audiovisual (responsable de la parte técnica de las transmisiones en directo y otras cuestiones relacionadas a medios digitales) con 9 miembros; Comisión Cultural (responsable de buscar artistas y atracciones para la apertura y clausura del evento), con 3 miembros; Comisión de Redes Sociales (responsable de las publicaciones e interacciones en las redes sociales del evento), con 5 miembros, y Tesorería (responsable de toda la parte financiera), con 2 miembros. En total, hubo más de 40 personas involucradas directamente con la organización principal.

2.4 Herramientas utilizadas

Varias herramientas digitales fueron utilizadas para la ejecución del evento. La primera fue la plataforma EVEN3 (https://www.even3.com.br/sabiovasf9), que ofrece gratis un sitio web para eventos académicos/científicos grande o pequeños. A pesar de todo el sistema de ser ofrecido sin costos, los organizadores tienen la opción de crear un evento gratis o pagado; si es pagado, la plataforma retiene un porcentaje variable que depende de varios criterios. Como el nuestro fue un evento pagado, aunque con una cuota de inscripción simbólica (R$ 10,00) a ser invertida en acciones filantrópicas, el sistema se quedó con una parte de los valores obtenidos.

Otras dos herramientas utilizadas conjuntamente fueron el *YouTube*, donde se creó un canal del evento con una cuenta institucional (https://www.youtube.com/c/SABIOVASF), y la plataforma *StreamYard*, por medio de la cual se hicieron las transmisiones en directo al *YouTube*. El *StreamYard* es una herramienta que permite suscripciones mensuales o anuales de acuerdo con lo que se quiera hacer y cuanto se pueda pagar. La versión pagada de esta plataforma permite que se pongan varias personas en una transmisión al mismo tiempo, además de muchas otras ventajas. También se utilizó la aplicación de mensajería instantánea *WhatsApp* para coordinar las acciones con los organizadores y ponentes del evento.

Para divulgar el evento en canales con impacto científico y enviar llamadas para sumisión de resúmenes, utilizamos los datos disponibles en el Directorio de Grupos de Investigación en Brasil (Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil). Esa plataforma contiene un inventario de los grupos de investigación científica y tecnológica en actividad en Brasil, incluyendo sus correos electrónicos (CNPQ, 2022). De esa manera, los integrantes de la comisión científica trabajaron en obtener datos de grupos relacionados a las Ciencias Biológicas, para cuyos correos las informaciones del evento fueron enviadas a fin de obtener inscripciones y participantes. Asimismo, el evento fue también divulgado en el sitio web oficial de la UNIVASF[1].

Por último, para la divulgación no institucional se utilizó la red social *Instagram*, a través de la cual se publicaron imágenes y videos con informaciones a cerca del evento, y por donde se organizó dos importantes actividades incluidas en la IX SABIOVASF: los concursos de fotografía e ilustración científica, abiertos a todos los participantes y juzgados con base en las ilustraciones y fotografías que más generaron reacciones de los seguidores (https://www.instagram.com/sabiovasfbiodiversidade/).

3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la Semana Académica de Biología (SABIOVASF)

1 https://portais.univasf.edu.br/noticias/univasf-esta-com-inscricoes-abertas-para-ix-semana-academica-de-biologia--sabiovasf

de la Universidad Federal del Valle de São Francisco (UNIVASF) es un evento científico/académico anual realizado por el Colegiado de Ciencias Biológicas de la UNIVASF desde 2010. Hubo ediciones continuas del 2010 al 2016, y la siguiente edición ocurrió en 2019. Asimismo, la novena edición, prevista para 2020, solo pudo ocurrir en 2021 teniendo en cuenta el escenario pandémico.

En comparación con las ediciones anteriores, los éxitos de la novena edición de la SABIOVASF pudieron ser visualizados en todos los criterios. Un primer aspecto que permite afirmarlo es la cantidad de resúmenes revisados por los participantes, que en esta edición totalizaron 81 trabajos aprobados después de la evaluación conducida por los revisores, aunque más de 100 fueron recibidos. La comparación con los números de las ediciones anteriores puede ser vista en la Figura 1. Vale aclarar que la primera edición no ofreció la posibilidad de sumisiones, razón por la cual la edición de 2010 tiene el número cero en la figura.

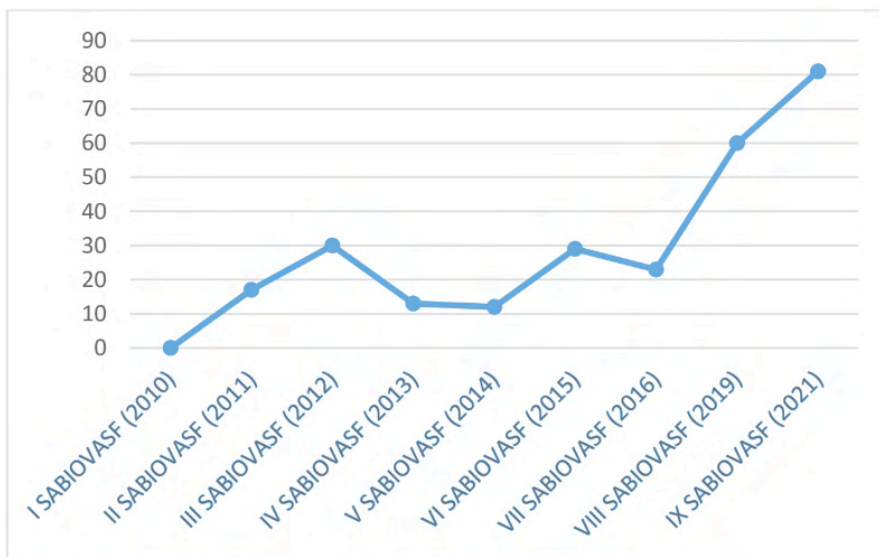



Figura 1: Comparación del número de resúmenes sometidos por edición de la SABIOVASF.

Los 81 resúmenes aprobados comprendieron las 8 áreas temáticas disponibles en las llamadas de sumisión, los cuales fueron: Botánica (23 resúmenes), Ecología y Biogeografía (12 resúmenes), Etnobiología (6 resúmenes), Genética (5 resúmenes), Inmunología, Parasitología y Salud (6 resúmenes), Microbiología (11 resúmenes), Zoología (15 resúmenes), y Limnología y Gestión Ambiental (3 resúmenes). Una representación gráfica de esa información puede ser vista en la Figura 2.

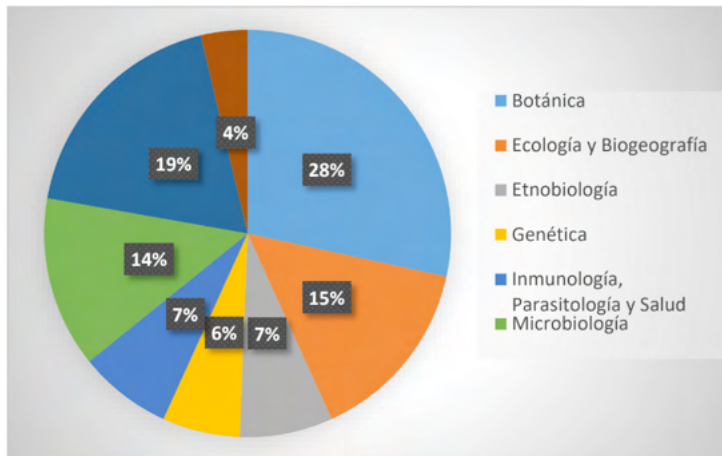



Figura 2: Proporción de resúmenes sometidos y aceptos por área temática

Por otro lado, la comparación de los participantes registrados en la IX SABIOVASF con las ediciones anteriores es difícil de hacerlo, ya que no hubo registros, en los anales anteriores, de cuantos participantes se registraron. Sin embargo, la novena edición alcanzó el gran éxito (por primera vez en la historia del evento) de recibir participantes de todas las 27 unidades federativas de Brasil, además de participantes extranjeros de Guatemala, India, México, Francia, Paraguay, Portugal y Sudáfrica. Por lo tanto, suponemos que esta fue también la edición con más registros. De esa manera, la cantidad de registros recibidos por estado de Brasil puede ser vista en la Figura 3.

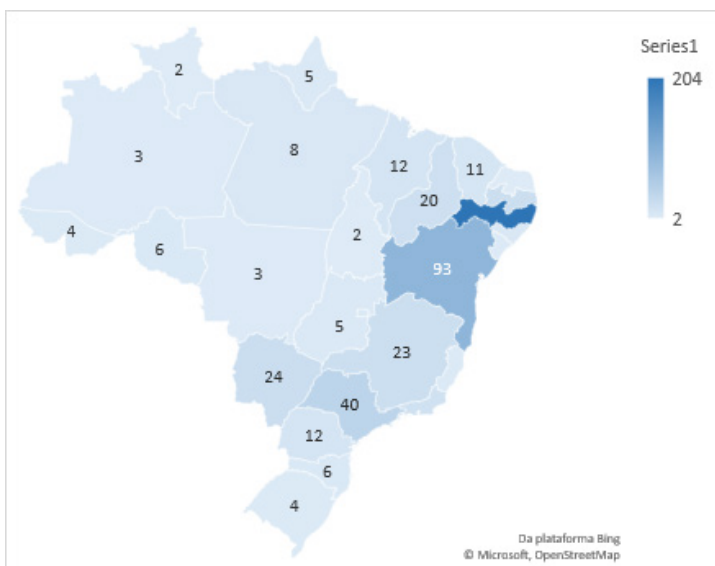



Figura 3: Proporción de participantes registrados por estado de Brasil.

Los participantes brasileños totalizaron 548 registros. Además, hubo también siete registros de Paraguay, cuatro de Guatemala, uno de Portugal, uno de India, y dos de México. En total, hubo más de 560 registros, superando hasta las expectativas iniciales de recibir a 500 participantes.

Este carácter internacional de la IX SABIOVASF, como dicho anteriormente, resultó en un evento realizado en tres idiomas distintos, aunque la traducción simultánea no estuviera disponible y los participantes tenían que comprender el idioma de las diferentes ponencias. De esa manera, las conferencias y mesas redondas fueron ofrecidas en Portugués, Inglés y Español, con la colaboración de varias instituciones internacionales que estuvieron disponibles en las ponencias de diversas áreas del conocimiento. En ese escenario, en el Cuadro 1 se puede visualizar la lista de las actividades ofrecidas durante los cuatro días del evento. Además, el mismo cuadro muestra el número de visualizaciones que cada actividad alcanzó, una vez que todas fueron transmitidas en directo a través de la plataforma YouTube. Esas informaciones están también disponibles en el canal del evento en YouTube (https://www.youtube.com/c/SABIOVASF/videos).

Actividad	Título	Nacionalidad de los ponentes	Numero de visualizaciones
Mesa redonda	Alternativas a antimicrobianos frente à crescente resistência de patógenos	Brasil	395
Mesa redonda	Biodiversidade de Povos de Tradição: Brasil e México	Brasil, México	516
Mesa redonda	Ornitologia e Falcoaria no Semiárido Brasileiro	Brasil	443
Mesa redonda	Taxonomia: Pavor à Primeira Vista	Brasil, Francia	329
Conferencia	Biodiversidade da Funga no Extremo Sul da Bahia	Brasil	299
Conferencia	Microalgae: Tiny Structures with Gigantic Importance	Brasil, India	383
Conferencia	Extinction of the Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*) and its meandering journey back to the Caatinga, Brazil	Brasil, Sudáfrica	290
Conferencia	A crise da biodiversidade à beira da sexta extinção em massa	Brasil	296
Conferencia	Variaciones morfométricas y del espacio geográficas entre poblaciones de *Leptodactylus laticeps* (Anura: Leptodactylidae) Chaco paraguayo	Brasil, Paraguay	361

Conferencia	Importancia de los murciélagos y desafíos para su conservación en Guatemala	Brasil, Guatemala	250
Conferencia	Taxonomia de Nematoides de Vertebrados Silvestres no Brasil	Brasil	247
Conferencia	Evaluación de la comunidad de mamíferos medianos y grandes en paisajes ganaderos del Departamento Boquerón - Paraguay	Brasil, Paraguay	258
Conferencia	Diversidade, Classificação e Taxonomia de Hymenoptera	Brasil	265
Conferencia	Ecología y Conservación del Jaguar en la Selva Maya	Brasil, Guatemala	298

Cuadro 1: Actividades ofrecidas en la IX SABIOVASF, con ponencias y mesas redondas en Portugués, Español e Inglés.

Los datos expuestos muestran claramente que esta edición de la SABIOVASF fue positivamente diferente de sus predecesoras en todos los aspectos evaluados.

Los autores/organizadores reconocen que, si el evento fuera realizado hoy, podría ser obtenido un alcance aún mayor. Sin embargo, es necesario tener en cuenta algunos aspectos importantes: el primero es que la SABIOVASF es un evento predominantemente organizado por alumnos. Así mismo, esta edición fue la que menos apoyo utilizó de los docentes de la carrera de Biología en la organización directa del evento, distinta de las ediciones anteriores, como puede ser visto en las composiciones de los equipos organizadores en los anales de las otras ediciones (UNIVASF, 2022). De esa manera, aunque contando casi exclusivamente con una organización liderada por estudiantes, el evento alcanzó todos los éxitos aquí presentados.

Otro importante aspecto es que muchas de las herramientas utilizadas fueron “descubiertas” mientras la organización del evento ya estaba en curso. Eso ocurrió porque, por lo dicho anteriormente, muchas adaptaciones tuvieron que ser hechas para adecuarse al escenario de actividades remotas, muchas de las cuales no habían sido exploradas antes de la pandemia o se conocía poco. De esa manera, el conocimiento adquirido con esa experiencia será sin duda un gran facilitador en ocasiones futuras.

En ese sentido, la forma de ejecución totalmente *online* de la IX SABIOVASF no solo permitió que ponentes y participantes pudieran acompañar el evento internacional, en varios países y continentes, sino que también los participantes pudieron interactuar en tiempo real con los ponentes a través del chat de *YouTube*, haciendo preguntas y comentarios que eran transmitidos a los invitados y respondidos al final de las presentaciones.

Además, esta fue también la primera vez en que los anales de la SABIOVASF fueron publicados con ISBN (*International Standard Book Number*), recibiendo, por lo tanto, la clasificación oficial como libro. De esa manera, los organizadores pudieron añadir en sus currículos esa experiencia, que es positiva e importante para los que siguen carreras

académicas. Los anales de la IX SABIOVASF fueron depositados en el acervo del Sistema Integrado de Bibliotecas de la UNIVASF, y pueden ser accedidos libremente por la internet (SIBI, 2022).

Por último, es válido decir también que los contactos realizados durante el evento resultaron en varios pedidos y posibilidades de conexiones con investigadores e instituciones de Brasil y del exterior, además de la creación de vínculos personales entre las personas involucradas. Asimismo, la Universidad Nacional de Asunción (UNA), por medio del consejo de su Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), declaró a la IX SABIOVASF como interés científico para la FACEN, a través de la Resolución Nº 0339/2021, por pedido de la Asociación de Estudiantes de Biología del Paraguay (AEBP).

4 I CONSIDERACIONES FINALES

Se puede concluir que el conjunto de las experiencias obtenidas durante la IX SABIOVASF, además de demostrar el significativo avance del evento comparado a sus ediciones anteriores, los éxitos obtenidos por todo el personal involucrado en la organización, y las positivas relaciones consolidadas en ese transcurso, son testigos indudables de la efectividad de la metodología organizadora utilizada, aunque improvisada en muchos momentos. Sin duda, los resultados obtenidos servirán de importante orientación para las organizaciones futuras de este tradicional evento de la carrera de Biología de la UNIVASF.

5 I REFERENCIAS

CDC. Omicron Variant: What You Need to Know. **Centers for Disease Control and Prevention**, 20 de diciembre de 2021. Disponible en: https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/omicron-variant.html. Accedido en: 24 de enero de 2022.

BBC. As 2 únicas universidades brasileiras em ranking de reputação global. **BBC NEWS Brasil**, 27 de octubre de 2021. Disponible en: https://www.bbc.com/portuguese/internacional-59045371#:~:text=A%20Universidade%20de%20S%C3%A3o%20Paulo,as%20posi%C3%A7%C3%B5es%20151%20e%20175. Accedido en: 24 de enero de 2022.

CERIONI, C.; ARANHA, C. O Brasil em lockdown: as regras para as cidades que vivem bloqueio total. **Exame**, 6 de mayo de 2020. Disponible en: https://exame.com/brasil/o-brasil-em-lockdown-as-regras-para-as-cidades-que-vivem-bloqueio-total/. Accedido en: 24 de enero de 2022.

DELTAFOLHA. Veículos de comunicação formam parceria para dar transparência a dados de Covid-19. **Folha de São Paulo**, 8 de junio de 2020. Disponible en: https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2020/06/veiculos-de-comunicacao-formam-parceria-para-dar-transparencia-a-dados-de-covid-19.shtml. Accedido en: 24 de enero de 2022.

G1. Mortes e casos conhecidos de coronavírus nos estados. **G1 São Paulo**. Disponible en: https://especiais.g1.globo.com/bemestar/coronavirus/estados-brasil-mortes-casos-media-movel/. Accedido en: 24 de enero de 2022.

OMER, S. B. *et al*. Promoting COVID-19 vaccine acceptance: recommendations from the Lancet Commission on Vaccine Refusal, Acceptance, and Demand in the USA. **Lancet**, v. 398, 2021. Disponible en: https://www.thelancet.com/action/showPdf?pii=S0140-6736%2821%2902507-1. Accedido en: 24 de enero de 2022.

UNIVASF. **Resolução 018/2020**: Aprova "ad referendum" manter a suspensão do Calendário Acadêmico 2020 (nos cursos presenciais de graduação e pós-graduação) da Univasf, por tempo indeterminado. 2020. Disponible en: https://sig.univasf.edu.br/sigrh/public/colegiados/filtro_busca_decisoes.jsf. Accedido en: 24 de enero de 2022.

UNIVASF. **Nossos Cursos**. 2016. Disponible en: https://portais.univasf.edu.br/apresentacao-univasf/nossos-cursos. Accedido en: 24 de enero de 2022.

UNIVASF. **SABIOVASF**. 2022. Disponible en: https://portais.univasf.edu.br/biologia/ciencias-biologicas/sabiovasf. Accedido en: 24 de enero de 2022.

WATANABE, P. Brasil ultrapassa 4.000 mortos por Covid em um só dia; número dobrou em menos de um mês. **Folha de São Paulo**, 6 de abril de 2021. Disponible en: https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2021/04/brasil-ultrapassa-4000-mortos-por-covid-em-um-so-dia-numero-dobrou-em-menos-de-um-mes.shtml. Accedido en: 24 de enero de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard**. Disponible en: https://covid19.who.int/. Accedido en: 24 de enero de 2022.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DE CONCORDANCIA ENTRE O MÉTODO DE ELUICAO EM DISCO COLISTINA E O MÉTODO DE REFERENCIA DE MICRODILUICAO EM CALDO PARA DETERMINAR A SUSCEPTIBILIDADE A COLISTINA, EM CEPAS CHILENAS SELECCIONADAS NO INSTITUTO SALUD PÚBLICA DE CHILE

Data de aceite: 01/02/2022

Henriette Chabouty García
Bioquímica Magister en Ciencias Médicas Mención Infecciones Intrahospitalarias y Epidemiología Hospitalaria. Facultad de Medicina,Universidad de Valparaiso, Chile.
Laboratorio Clínico sección Microbiología, Hospital Dr. Gillermo Grant Benavente Concepción, Chile
Chile

Ingrid Araya Diaz
Tecnólogo Médico Encargado Sección Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, Laboratorio Biomédico, Instituto Salud Pública de Chile
Santiago, Chile

Pamela Araya Rodriguez
Bioquímica, Jefa Sección Bacteriología, Laboratorio Biomédico, Instituto Salud Pública de Chile
Santiago, Chile

RESUMEN: El objetivo del estudio fue medir la concordancia entre el método de elución en discos de colistin y el método de referencia microdilución en caldo para interpretar susceptibilidad a Colistin en cepas clínicas recepcionadas en el Instituto de Salud Pública de Chile. Un total de 106 cepas (49 Enterobacterales, 30 *Pseudomonas aeruginosa*, 27 *Acinetobacter baumannii*) fueron testeadas en forma paralela por los dos métodos, encontrandose un 2% de errores muy mayores en el grupo de Enterobacterales, un 3,3% de errores muy mayores para *P aeruginosa* y un 11,1% de errores muy mayores en *A baumannii*. El estudio del gen mcr-1 por PCR en las cepas resistentes a colistin dio resultados negativos. Los resultados muestran que el método de elución de disco de colistin tiene buena concordancia para determinar susceptibilidad a colistin en Enterobacterales y *P aeruginosa.*

PALABRAS CLAVE: Resistencia a Colistin, microdilución en caldo, elución de sensidiscos.

CONCORDANCE STUDY BETWEEN THE COLISTIN DISK ELUTION METHOD AND THE BROTH MICRODILUTION REFERENCE METHOD TO DETERMINE SUSCEPTIBILITY TO COLISTIN, IN SELECTED CHILEAN STRAINS AT THE INSTITUTE OF PUBLIC HEALTH OF CHILE

ABSTRACT: The objective of the study was to measure the concordance between the colistin disk elution method and the broth microdilution reference method to interpret susceptibility to Colistin in clinical strains received at the Institute of Public Health of Chile. A total of 106 strains (49 Enterobacterales, 30 *Pseudomonas aeruginosa*, 27 *Acinetobacter baumannii*) were tested in parallel by the two methods, finding 2% of very higher errors in the Enterobacterales group, 3,3% of very higher errors for *P. aeruginosa* and 11,1% of much langer errors in A baumannii. The study of the mcr-1 gene by RCP in colistin-resistant strains gave negative results. The results show that the colistin disk elution method has good agreement for determining susceptibility to colistin in Enterobacterales and *P aeruginosa*.

KEYWORDS: Colistin-resistance; broth microdilution; sensi-disk elution.

INTRODUCCIÓN

Cada vez es más frecuente que los clínicos se enfrenten a infecciones producidas por bacterias multiresistentes, produciendo un panorama complejo para el tratamiento debido al escaso arsenal terapéutico disponible. En Chile el perfil de resistencia antimicrobiana de nuestras cepas posiciona al colistín como una alterntiva para tratar estas infecciones (1). Se hace necesario entonces que el laboratorio de microbiología implemente y estandarice métodos rápidos y confiables para determinar su susceptibilidad *in vitro* ya que se ha demostrado que existen dificultades en la metodología en el método de difusión en agar y los test de gradiente producto de la mala difusión de la molécula de colistin en agar Mueller Hinton, las propiedades catiónicas de las polimixinas y la aparición de hetero-resistencia a polimixinas en muchas especies (2,3,4)

La CLSI (Clinical and Laboratory Standart Institute) indica que el método de referencia o gold estándar para la determinación de susceptibilidad a colistín es la microdilución en caldo, pero este método es de compleja implementación y carece de la rapidez necesaria para este tipo de pruebas en un laboratorio de rutina. Por ello desde 2020 ha recomendado el método de elución de discos de colistin, el cual es de fácil ejecución y de bajo costo (5).

En los estudios de susceptibilidad los sistemas automatizados presentan resultados con importante porcentaje de error muy mayor al informar sensible cepas que son resistentes. Todo esto hace necesario la rápida incorporación de un método confiable, sensible, específico y de baja complejidad para ser aplicado en el laboratorio (6,7).

OBJETIVO

Conocer la concordancia del método de elución de discos de colistin comparado con el gold estádar el método de microdilución en caldo para el estudio de la susceptibilidad a colistin y evaluar la presencia de errores mayores y errores muy mayores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 106 cepas seleccionadas de las recibidas en el Laboratorio de Referencia de infecciones asociadas a la atencion en salud (IAAS) del Instituto de Salud Publica de Chile (49 Enterobacterias, 30 *Pseudomonas aeruginosa*, 27 *Acinetobacter baumannii*). A todas ellas se les realizó estudio de susceptibilidad al colistin por método de elución en discos de colistin y por microdilución en caldo considerada como método de referencia (CLSI 2020). La CLSI considera como resistente aquellas cepas con una CIM >= 4 ug/ml e Intermedio con una CIM <= 2 ug/ml , no estableciendose la categoría de susceptible, puesto que los estudios farmaco-cineticos y farmaco-dinámicos han

demostrado un limitada eficacia clínica para este antimicrobiano, recomendándose ser administrado junto con uno o mas agentes antimicrobianos. El método de elusión en discos de colistin no se encuentra validado por la CLSI para cepas de *Acinetobacter spp.*

Las cepas que mostraron resistencia por técnica estándar se les efectuó estudio de PCR en búsqueda del gen mcr-1.

Para análisis de resultados se utilizó estudio estadístico de concordancia donde al comparar un método diagnóstico frente a un método de referencia se espera que la concordancia en la categoría de interpretación sea mayor o igual al 90% entre ambos. Se entiende por categoría de interpretación al resultado cualitativo de resistente, susceptible o intermedio que presenta la cepa según la CIM presentada con respecto a los puntos de corte estandarizados. Es así que se clasifica como un error mayor cuando se interpreta un resultado con la categoría resistente y es susceptible por método de referencia y a su vez, se clasifica como un error muy mayor cuando se interpreta un resultado como susceptible y es resistente por el método de referencia.

RESULTADOS

El estudio de susceptibilidad a colistin utilizando la método de elución de disco muestra un 95% de concordancia, donde del total de cepas estudiadas 5/106 cepas presentaron errores muy mayores de interpretación. De ellas 1/ 49 cepas con errores muy mayores para Enterobacterales, 1/30 cepas con errores muy mayores para *Pseudomonas aeruginosa* y 3/27 cepas con errores muy mayores para *Acinetobacter baumannii* . No se presentaron errores mayores, pues no hubo falsos resistentes.

El estudio del gen mcr-1 por RCP en las cepas resistentes a colistin dio resultados negativos dando cuenta que la resistencia a colistin se encuentra en estas cepas mediada por otros mecanísmos de resistencia.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el método de elución de disco de colistin tiene buena concordancia para determinar susceptibilidad a Colistin en Enterobacterales y *P aeruginosa* no asi para *A baumannii* donde se debería efectuar el método de referencia microdilución en caldo.

Nuestro estudio no mostro errores mayores, es decir falsa resistencia, para ninguno de los tres grupos bacterianos testeados.

Un estudio efectuado en Chile (8) analiza cepas del complejo *A. baumannii* previamente interpretadas como resistentes por el método de referencia. Ellos demostraron que al agregar Tween-80 (0,002%) al caldo Mueller Hinton en la microdilución, se obtenía una disminución en >= a dos diluciones en la CIM, disminuyendo la falsa resistencia del método de referencia (8). Actualmente la CLSI no incorpora Tween-80 como coadyuvante

para la determinación de CIM. Sería de interés efectuar estudios posteriores con mayor número de cepas utilizando esta metodología.

Es importante destacar que la técnica de elución de discos permite al clínico tener una CIM aproximada, confiable y de bajo costo en forma rápida para dar el mejor tratamiento antimicrobiano a su paciente.

Finalmente nosotros recomendamos el método de elución de discos para determinar susceptibilidad a Colistin en Enterobacterales y *P aeruginosa.*

REFERENCIAS

1.- Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Dominguez M, Gonzalez-Rocha G. Colistin en la era post-antibiótica. Rev. Chilena Infectol 2016; 33: 166-76

2.- Bakthavatchalam Y D, Pragasam A K, Biswas I, Veeraraghavan B. Polimyxin susceptibility testing interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. J Glob Antimicrob Resist 2018; 12: 124-36.

3.- Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing and resistance mechanisms encoded by plasmid or chromosomes. Clin Microbiol Rev 2017; 30: 557-96

4.- Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, Yi L X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism of colistin resistance and their impact on virulence in Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58: 518-26.

5.- Clinical and Laboartory Standards Institute (CLSI). M100, 30th Edition, 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

6.- Simner P J, Bergman Y, Trejo M, Roberts A A, Marayan R, Tekle T et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against gramm-negative bacilli. J Clin Microbiol 2019; 57 (2):e01163-18.

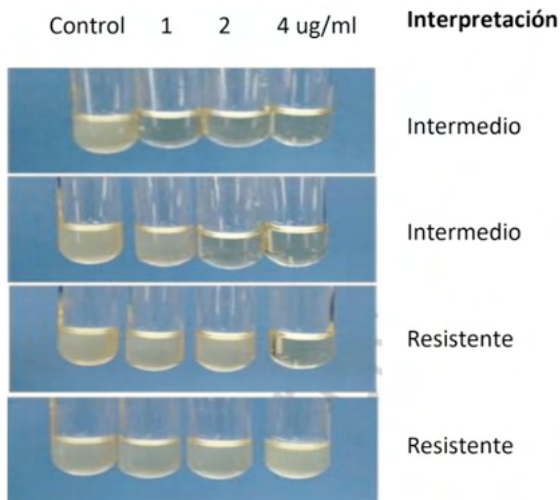
7.- Protocolo para determinación de Concentración Inhibitoria Mínima por el método de Microdilución. Aplicación para determinar la sensibilidad a Colistin. Servicio de Antimicrobianos. Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS. “Dr. Carlos Malbrán”

8.- Villanueva X, Opazo-Capurro A, Quezada-Aguiluz M, Dominguez M, Bello-Toledo H, Gonzalez-Rocha G. ¿Se debe revisar la determinación de la CIM de colistin en Acinetobacter baumannii? Rev Chilena Infectol 2017; 34:413-4.

ANEXOS

Tabla Nº 1: Porcentaje de errores presentados en estudio de concordancia entre método de elución en discos de colistin y técnica de referencia microdilución en caldo.

Tipo de aislado	n	Error muy mayor	Error mayor	Error total
Enterobacterales	49	1/49 = 2,0	0/49 = 0	2,0
P aeruginosa	30	1/30 = 3,3	0/30 = 0	3,3
A baumannii	27	3/27 = 11,1	0/27 = 0	11,1
TOTAL	106	5/106 = 4,7	O/106 = 0	4,7

Metodo elución en discos de Colistin

Tecnica microdilución en caldo colistin

CAPÍTULO 4

Girardinichthys viviparus ESPÉCIES ENDÊMICAS DO VALE DO MÉXICO

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 08/12/2021

José Luis Gómez-Márquez
Laboratory o Limnology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
México
ORCID ID 0000-0003-0962-5368

Bertha Peña-Mendoza
Laboratory of Limnology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
México

José Luis Guzmán-Santiago
Laboratory of Limnology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
México

Girardinichthys viviparus ENDEMIC SPECIES OF THE VALLEY OF MEXICO

ABSTRACT: A population of Chapultepec splitfin *Girardinichthys viviparus* was registered in the urban Lake Alameda Oriente. Biometry data for females and males are including for first time for this urban lake of Mexico City. The main causes of risk reported for this species in the aquatic system are water depletion and habitat alteration by treated wastewater used to keep the water level of lake.
KEYWORDS: Freshwater, urban lake, threatened species, fish.

Girardinichthys viviparous ESPECIE ENDÉMICA DEL VALLE DE MÉXICO

RESUMO: Uma população de Chapultepec splitfin Girardinichthys viviparus foi registrada no lago urbano Alameda Oriente. Os dados de biometria para mulheres e homens estão incluídos pela primeira vez neste lago urbano da Cidade do México. As principais causas de risco relatado para esta espécie no sistema aquático são o esgotamento da água e alteração do habitat por águas residuais tratadas usadas para manter o nível de água do lago.
PALAVRAS-CHAVE: Água doce, lago urbano, espécies ameaçadas, peixes.

INTRODUCTION

Mexico is among the five countries in the world with the highest biological diversity, not only because it has a large number of species, but also in terms of other aspects such as ecosystem and genetic variability (Neyra and Duran, 1998; Bezaury *et al.*, 2000). In addition, the Mexican territory includes areas whose biodiversity is poorly known (CONABIO, 2002). Family Goodeidae is between the most important Mexican freshwater fishes. This fish are grouped in only Mexicans who are characterized by sexual dimorphism, prenuptial courtship and viviparity, which lead to a series of morphological, anatomical and physiological characteristic of the group (Díaz-Pardo and Ortíz-Jiménez, 1986). Goodeidae family in

Mexico is represented by approximately 42 species viviparous fish (Paulo-Maya and Trujillo-Jiménez, 2000), includes 36 live-bearing species largely confined to the Rio Lerma basin in the highlands of Central Mexico (Espinosa *et al.* 1993; Moyle and Cech, 2000; Miller *et al.*, 2005; De la Vega-Salazar, 2006). At present, mexclapique or Chapultepec splitfin (*Girardinichthys viviparus*) is endemic to basin of Mexico: Lakes Xochimilco, Zumpango, Texcoco, Chapultepec (Alvarez del Villar and Navarro, 1957; cited in Sedeño-Díaz and López-López, 2009). Although Espinosa *et al.* (1993) cited to *G. viviparus* as endemic to the Valley of Mexico, also there are records that indicate their presence in the upper basin of Pánuco in the Tula River (Alvarez del Villar, 1970; Díaz, 2002) and Lake Tecocomulco (Miranda *et al.*, 2009).

In Mexico, there has been no detailed limnological study (Arredondo-Figueroa and Flores-Nava, 1992, Martinez-Arroyo and Jáuregui, 2000; Schueler and Simpson, 2001), despite the biological and economic importance many inland water bodies and mainly in urban areas, and such bodies of water have been modified by the constant supply of nutrients (Quirós, 2007).

Urban lakes are important aquatic environments for large cities, because they are recreation areas for its inhabitants (Labounty, 1995; Elías-Fernández *et al.*, 2006). They are very different from other lakes: they are shallow, vary greatly in size, depth, relationship drained area/surface water body, water balance, nutrient cycling and trophic status, highly artificial and often hypertrophic yet more people come into contact with them than rural, natural lakes. This aquatic system have received little attention in the limnological and watershed management literature, and our knowledge of their ecology and management is poor (Birch and McCaskie, 1999; Schueler and Simpson, 2001; Espinosa-Castillo, 2008).

Nowadays the urban lakes in Mexico City continue to play an important societal role as sources of fisheries, cultural and recreation, and they are highly valued by the Mexican people. They are also of great interest to aquatic scientists, having unique limnological and biotic characteristics and supporting numerous endemic species. We present a short communication on a threatened freshwater fishes from central Mexico.

MATERIALS AND METHODS

During an ongoing study of environmental quality and biota of Lake Alameda Oriente (Fig. 1), a total of 281 fishes were collected in two peripheral areas of Lake Alameda Oriente (19°26’N; 99°03’’ W; 2234 m.a.s.l.) in March 2008, with a seine 5 m long and 1.0 m deep, with 5 mm mesh. 81 specimens were fixed in 10 % formaldehyde. Specimens were then transported to the laboratory; measurements were made by vernier callipers reading to 0.1 mm and weighed to the nearest 0.01 g and dissected to determine sex. Some specimens were returned to the water. The sex ratio was analyzed for the whole population. The statistical significance of the ratio results was established by a goodness of fit Chi-squared

test (χ^2).

A covariance analysis was conducted to determine whether or not there were significant differences at $p<0.05$ for the length-weight relationship between both sexes. The Total length (TL)-total body weight (TW) relationship was calculated by a power regression between these variables for each sex using the formula:

$$TW = aTLb$$

where TW is the body weight, SL the standard length, *b* the growth exponent or length-weigh factor, and *a* is a constant. The values of a and b were estimated by means of a linearized form of that equation by taking (base 10) logarithms on both sides and estimating the values of log (a) and log (b) by means of a linear regression, using ordinary least-squares regression. Student's *t*-test was used to the hypothesis of isometric growth (Pauly, 1984). The catalogue number of voucher specimens is IB-UNAM 14728.

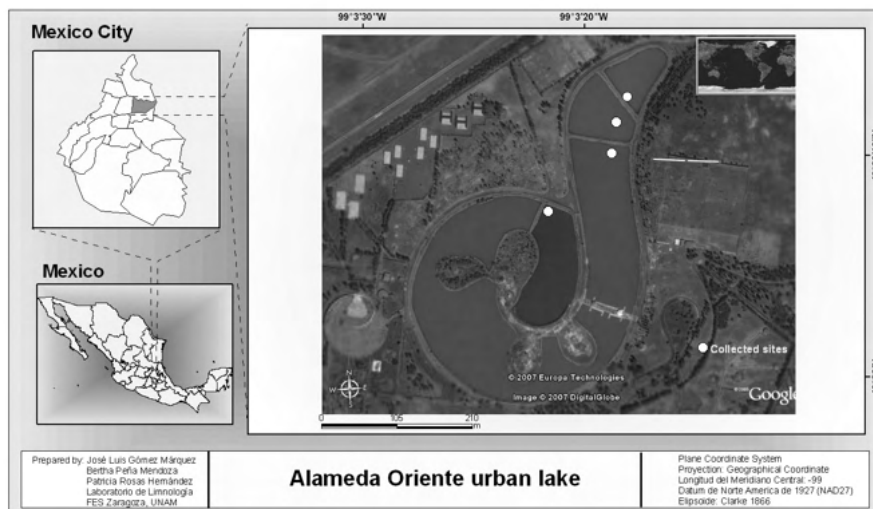



Fig. 1 Study area of Alameda Oriente urban lake.

RESULTS

Among the fishes captured, 81 specimens of Chapultepec splitfin G*irardinichthys viviparus* (Bustamante 1837) were identified following the descriptions provided in previous publications (Alvarez del Villar, 1970; Radda and Meyer, 2003; Miller *et al.,* 2005) such as the black colour of the breeding male; the presence of 18–26 rays in the anal fin; dark blotch above anus small and inconspicuous or absent; fin base longer than longest rays and dorsal and anal base with the same length in males; rudimentary gonopodium with 6–8 anal branched and short rays, separated by notch from remainder of fin. Diagnosis and measurements are given in Table 1. Some specimens were deposited in the Fishes

Laboratory of Biology Institute, U.N.A.M., in order to check the identity of the species.

These data constituting the first record of total body length (TL), standard body length (SL), and body weight (TW) for males and females of this species in the urban lake. Total body length and weight ranged from 18 to 49 mm and 0.07 to 1.92 g for males, and from 20 to 61 mm and 0.06 to 3.98 g for females. Females were larger than males (*t*-value = 10.78; $p<0.05$) (Fig. 2).

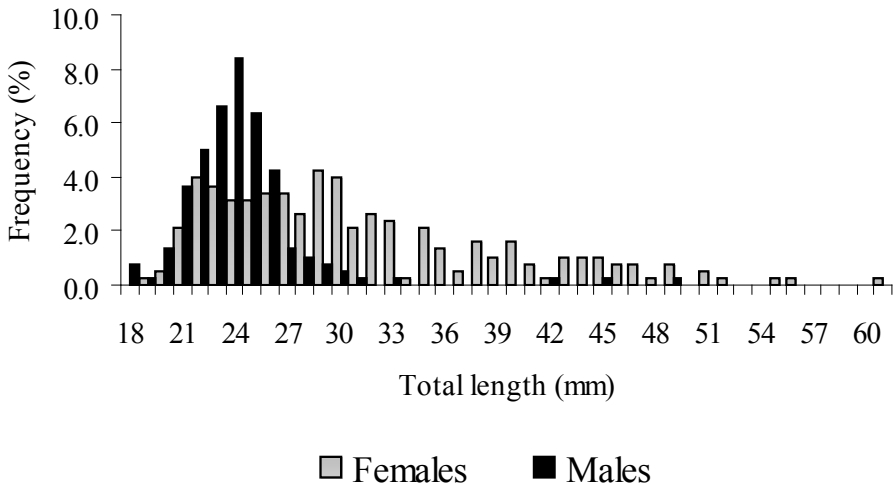



Fig. 2. Length-frequency distribution of *Girardinichthys viviparus* at Alameda Oriente urban lake, Mexico City.

Of the 81 adults specimens dissected, 24 (29.6%) were males and 57 (70.4%) were females. The sex ratio of the catch as a whole was 2.4:1 (female:male), significantly different from a 1:1 ratio (χ^2= 13.44, $p<0.05$). The females dominated significantly in this aquatic system in the monitoring.

	Lt(mm)	Ls(mm)	Bw(mm)	D	P	V	A	C
Females	35.9±9.7 (20-61)	30.6±8.7 (17-53)	8.4 ±3.4 (4-17)	19±0.8 (18-21)	16±0.5 (15-16)	6±0.4 (5-6)	20±1.1 (18-23)	29±1.9 (24-31)
Males	27.7±6.9 (18-49)	23.1±6.2 (15-42)	5.7 ± 2.6 (3-13)	19±1.0 (18-20)	16±0.5 (15-16)	6±0.2 (5-6)	20±1.0 (19-22)	27±1.8 (24-30)

Table 1. Lengths (mm), weight (g) and meristic traits of *Girardinichthys viviparus* specimens studied from Lake Alameda Oriente, distinguishing males (n = 24) and females (n = 57). Values are means ± S.D., range in parentheses.

LT, total length; LS, standard length; Bw, body weight; D, dorsal fin rays; P, pectoral fin rays; V, ventral fin rays; A, anal fin rays; C, caudal fin rays.

Length-weight relationship: This relation was evaluated for all individuals, and for each sex separately (females and males), although there is not significant difference between the male and female slopes of TW-TL regressions (ANCOVA; $F = 0.18$, $p>0.05$). These equations are given below:

Females:	TW = 0.000003	$TL^{3.445}$;	$R^2 = 0.980$,	$p<0.05$
Males:	TW = 0.000006	$TL^{3.267}$;	$R^2 = 0.937$,	$p<0.05$
All fishes:	TW = 0.000004	$TL^{3.402}$;	$R^2 = 0.975$,	$p<0.05$

Weight increased allometrically with size (Fig. 3), since *b* value had a significant difference from 3 ($t = 8.049$, $p<0.05$ for females, and $t = 2.816$, $p<0.05$ for males). For the same length, females weight were equals than males.

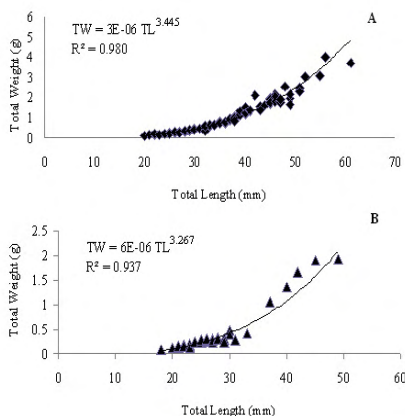



Fig. 3. Length-weight relationship for females (**A**) and males (**B**) of *Girardinichthys viviparus.*

DISCUSSION

The specimens collected in Lake Alameda Oriente were bigger in contrast with those reported by Miranda et al. (2008) and Sedeño-Díaz and López-López (2009). Probably, in this aquatic system the fishes have good environmental and trophic condition to survive, it has to adapt to a stressful environment for the type of treated wastewater used to keep the lake level, mainly in dry season.

Nikolsky (1963) mentioned that the larger sizes of females result from a differential growth rate with respect to males. In our study, females probably have higher survivorship rates due to their larger size, are longer-lived than males, and are more resistant to the rigors

of reproductive effort. Cházaro (1989) cited that the larger size of *C. jordani* is influenced by changes in the food supply and represents an adaptive response of the population to environmental changes, as in this urban lake occurred.

Sex ratio for *G. viviparus* in Alameda Oriente urban lake indicates that males and females have different abundances, and in this case deviation from the expected 1:1 (male:female) was significant. Nikolsky (1963) pointed out that the sex ratio varies considerably from one species to another, but in the majority of cases it is close to one, and may vary from one year to the next in the same population. Moreover, in this study the female:male sex ratio was 2.4:1 and variations in sex ratio could reflect natural population dynamics.

With respect to a differential sex distribution, van Aerle *et al.* (2004), Devlin and Nagahama (2002) and Guerrero-Estévez and Moreno-Mendoza (2009) pointed out that there is a large variety of mechanisms of sexual determination. These may be genetic, or depend on environmental conditions such as temperature, pH, and community factors, all of which can influence sexual proportion in a population. In addition, van Aerle *et al.* (2004) cited that there are a wide range of chemicals discharged into the environment that mimic hormones, especially estrogens, and sex steroids play an important role in the regulation of sexual differentiation, and this could be affect to the population.

Respect to the relationship between length and weight, Ricker (1979) mentioned that when fish have a *b* coefficient value significantly different from three, the growth is allometric. This is the case of the present study, body grows slower in length than weight, and an exponent more greater than 3 would indicate that the fish becomes heavier as it increases in size. Probably in this aquatic system the population has acceptable conditions of food. In addition, the relationship between length and weight provides an index frequently used by fisheries biologists to quantify the state of well-being of a fish (Wootton, 1990).

Lake Alameda Oriente is an artificial water body in the basin of Valle de Mexico. This basin covered the region that now is the modern Mexico City and environments. The other former bodies of water that formed the Gran Cuenca now are either greatly altered or extremely contaminated by secondarily-treated wastewater (Elías-Fernández *et al*., 2006).

Lake Alameda Oriente varies from 8 to 9 ha, depending on the quantity of seasonal rainfall and domestic wastewater that receives. The lake has turbid and shallow waters, normally with 0.5–1.5 m maximum depth. Water temperature between 16 to 25 °C, dissolved oxygen range from 0.63 to 24.9 mg/L, pH alkaline (mean 9.8 units), sodium, bicarbonates, carbonates and sulphates are the dominant ions and bigger proportions of calcium, and magnesium are present (Montaño, 2010).

The natural distribution of *G. viviparus* was restricted to two localities in the central and southern parts of the central basin of Mexico, Lakes Texcoco and Zumpango (Miller *et al*., 2005). According to literature, *G. viviparus* has been reported around of Mexico City, Lake Chalco, Lake Xochimilco, Lake Chapultepec, Requena reservoir, and Lake Texcoco

(Navarrete *et al.*, 2003). Recently this species has been discovered and reported by Miranda et al. (2008) in Lake Tecocomulco, Hidalgo, which is the only remaining natural water body in the Valle de Mexico basin (Caballero *et al.*, 1999). However, Navarrete *et al.* (2003), Navarrete *et al.* (2004) and Sedeño-Díaz and López-López (2009) mentioned that *G. viviparus* is known to be extinct in Lake Zumpango and Requena reservoir, as a result of receives domestic and industrial wastewater.

Direct anthropogenic effects have altered and contaminated its natural environment (Contreras-Balderas *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2004; Contreras-Balderas, 2005; De la Vega-Salazar, 2006) and in particular as a result of water exploitation for urban, agricultural and industrial needs (Díaz-Pardo and Ortíz-Jiménez, 1985; De la Vega-Salazar, 2006). Furthermore, it is under considerable pressure from a range of anthropogenic activities, including water extraction for consumption, habitat degradation by pollution, reductions in surface water levels and the introduction of exotic species mainly (Soto-Galera and Paulo, 1995; Lyons *et al.*, 1998; Contreras-Balderas, 2005; De la Vega-Salazar and Macías-García, 2005; Contreras MacBeath and Rivas, 2007).

G. viviparus is an endangered goodeid with an extremely reduced range of distribution in the Mexican plateau, only known from a few locations near to Mexico City (Navarrete *et al.*, 2003; Navarrete *et al.*, 2004). This species has been catalogued as part of the numerous threatened freshwater fishes of Mexico (Williams and Miller, 1990; Contreras-Balderas *et al.*, 2003; Contreras-Balderas, 2005; Sedeño-Díaz and López-López, 2009; Diario Oficial, 2010).

Nowadays, this species appears to be abundant in Lake Alameda Oriente, but due to the protected status of the species an attempt was made at this time to provide a more precise estimation of population biology with the not many data obtained. The greatest threats to the long-term existence of *G. viviparus* in the lake emerge from tourist activities and their effect on the lake habitat such as irrigation for surrounding fields. Lake Alameda Oriente should be protected as it hosts the largest population of *G. viviparus* ever discovered. Urgent conservation and management measures are needed to preserve both the volume of the body of water and its quality as a natural habitat for this species.

In all countries, a conservation strategy should be developed to protect remaining natural communities that support a relatively intact native fish fauna. The introduction and establishment of non-native species have resulted in severe declines of native fishes in México (Contreras-Balderas, 2005; Contreras MacBeath and Rivas, 2007).

Canonico *et al.* (2005), Gozlan (2008) and Schlaepfer *et al.* (2011) mentioned that non-native species can cause the loss of biological diversity (i.e., genetic, species, and ecosystem diversity) and threaten the well-being of humans when they become invasive. However, in some cases, they can also provide conservation benefits. Non-native species can also have desirable effects on an ecosystem. Numerous species have been repeatedly and deliberately introduced outside their native range for agricultural, ornamental,

aquaculture and recreational purposes. As a result non-native species are integral to the culture and economies of most countries.

Freshwater ecosystems in Mexico are specifically vulnerable due to degradation and exploitation to be subject, making it difficult to establish conservation strategies for species of this family. However, it is necessary to recognize the importance of developing specific programs to protect water quality and habitat, and to ensure the conservation of flora and fauna of freshwater. The destruction of biotopes all around Mexico City is dramatic and gets worse rapidly. The last surviving fish species endemic to the basin of Mexico requires urgent protection of its population as cited by Miranda et al. (2008) and Sedeño-Díaz and López-López (2009).

ACKNOWLEDGMENTS

This work received support from FES Zaragoza, UNAM, Mexico. We are indebted to L.C. Huidobro for the support in to identify of species. B.O. Castillo and L.G. Montesino assisted in the collection and measurement of the fish, and two anonymous reviewers for discussion and comments on previous versions of this manuscript.

REFERENCES

Álvarez del Villar, J. 1970. Peces Mexicanos (Claves). Comisión Nacional Consultiva de Pesca. Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. S.I.C. México. 166 p.

Alva, M. A. F. and Otto, E. S. P. 2006. Estrategias de manejo de la calidad del agua de los lagos del Distrito Federal. In: El agua en la ciudad de México. Encuentro Internacional de Experiencias por el Agua. Tlalocan. Festival Internacional por el Agua. 14 al 16 de marzo. Palacio de Minería, D.F., México. Pp. 505-509.

Arredondo-Figueroa, J. L. and A. Flores-Nava. 1992. Características limnológicas de pequeños embalses epicontinentales, su uso y manejo en la acuacultura. Hidrobiológica 3/4: 1-10.

Bezaury, C. J. E., R. Waller, L. Sotomayor, X Li, S. Anderson, R. Sayre and B. Houseal. 2000. Conservation of biodiversity in Mexico: Ecoregions, sites and conservation targets. The Nature Conservancy Mexico, Division, Conservation Science and Stewardship. 122 p.

Birch, S. and J. McCaskie. 1999. Shallow urban lakes: a challenge for lake management. Hydrobiologia 395-396: 365-378.

Caballero, M., S. Lozano, B. Ortega, J. Urrutia and J.L. Macias. 1999. Environmental characteristics of Lake Tecocomulco, northern basin of Mexico, for the last 50,000 years. Journal of Paleolimnology 22: 399–411

Canonico, C. G., A. Arthington, K.J. Mccrary and L.M. Thieme. 2005. The effects of introduced tilapias on native biodiversity. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 15: 463–483. DOI: 10.1002/aqc.699.

Cházaro O. S. 1989. Estudio sobre algunos aspectos de la Biología del charal *Chirostoma jordani* en el embalse Trinidad Favela, Edo. de México. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala. UNAM. México. 78 p.

CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2002. Lista de regiones hidrológicas prioritarias. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/Hlistado.html (accessed March 2011).

Contreras-Balderas S. and P. Almada-Villela. 1996. *Girardinichthys viviparus*. In: IUCN (2007). 2007 IUCN Red List of Threatened Species. Available from www.iucnredlist.org (accessed March 2010).

Contreras-Balderas, S., P. Almada-Villela, M. L. Lozano-Vilano and M. E. García-Ramírez. 2003. Freshwater fish at risk or extinct in México. A checklist and review. Review of Fish Biology and Fisheries 12: 241–251.

Contreras-MacBeath, T. and J.M. Rivas. 2007. Threatened fishes of the world: *Notropis boucardi* (Günther 1868) (Cyprinidae). Environmental Biology of Fishes 78: 287–288. DOI 10.1007/s10641-006-0039-8.

Contreras-Balderas, S. 2005. Conservation Status of Mexican Freshwater Viviparous Fishes. In M. C. Uribe and H. J. Grier, editors. Viviparous Fishes. New Life Publications, México. Pp. 415-423.

Cooper, III F.R. 1991. Some considerations for managing urban lakes. In K. J. Hatcher, editor. Proceedings of the 1991 Georgia Water Resources Conference, March 19 and 20. Institute of Natural Resources. The University of Georgia, Georgia. Pp. 173-174.

De la Vega-Salazar, M.Y. and C. Macías-García. 2005. Principal Factors in the Decline of the Mexican Endemic Viviparous Fishes (Goodeinae:Goodeidae). In M. C. Uribe and K. J Grier, editors. Viviparous Fishes. New Life Publications, México. Pp 506-513.

De la Vega-Salazar, M.Y. 2006. Estado de conservación de los peces de la familia Goodeidae (Cyprinodontiformes) en la mesa central de México. Revista de Biología Tropical. (International Journal of. Tropical Biology) 54(1): 163-177. Devlin, H. R. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.

Diario Oficial. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. 30 de diciembre 2010. México, D.F. 78 p.

Díaz-Pardo, E. and D. Ortiz-Jiménez. 1986. Reproducción y ontogenia de *Girardinichthys viviparus* (Pisces:Goodeidae). An. Esc. Nal. de Cienc. Biol., IPN, México, D.F. 30(1-4): 45-66.

Díaz, P. E. 2002. *Girardinichthys viviparus*. Peces en riesgo de la Mesa Central de México. Laboratorio de Ictiología y Limnología, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W039. México. D.F. 6 p. available from http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Girardinichthysviviparus00.pdf (accessed July 2011).

Elías-Fernández, G., N. A. Navarrete-Salgado, J. L Fernández-Guzmán and G. Contreras-Rivero. 2006. Crecimiento, abundancia y biomasa de *Poecilia reticulata* en el lago urbano del parque Tezozomoc de la ciudad de México. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 12(2): 155-159.

Espinosa, P.H., M. T. D. Gaspar and P. M. Fuentes. 1993. Listado Faunístico de México. III. Los peces dulceacuícolas mexicanos. Instituto de Biología, UNAM, México. 99 p.

Espinosa-Castillo, M. 2008. Procesos y actores en la conformación del suelo urbano en el ex lago de Texcoco. Economía. Sociedad y Territorio VIII (27): 769-798.

Guerrero-Estévez, S. and N. Moreno-Mendoza. 2009. Sexual determination and differentiation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries DOI 10.1007/s11160-009-9123-4.

Gozlan, R. E. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? Fish and Fisheries 9: 106–115.

Labounty, J. 1995. What's an urban lake worth? Lakeline 15: 6-7.

Lyons, J., G. González-Hernández, E. Soto-Galera and M. Guzmán-Arroyo. 1998. Decline of freshwater fishes and fisheries in selected drainages of best-central Mexico. Fisheries 23(4): 10-17.

Martínez-Arroyo, A. and E. Jáuregui. 2000. On the environmental role of urban lakes in Mexico City. Urban Ecosystems 4: 145–166.

Miller, R. R., W. L. Winckley and S. M. Norris. 2005. Freshwater fishes of México. The University of Chicago, Chicago. 490 p.

Miranda, R., D. Galicia, G. Pulido-Flores and S. Monks. 2008. First record of *Girardinichthys viviparus* in Lake Tecocomulco, Mexico. Journal of Fish Biology: doi:10.1111/j.1095-8649.2008.01929.x

Montaño, S. I. 2010. Aspectos hidrobiológicos en dos esclusas del lago artificial del Parque de la Alameda Oriente. Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza, UNAM, México. 92 p.

Moyle, P. B. and J. J. Cech. 2000. Fishes. An Introduction to Icthyoltgy. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 612 p.

Navarrete, S. N. A., G. R. Contreras and G. F. Elias. 2003. Abundancia y estatus sanitario del mexclapique (*Girardinichthys viviparus* Bustamante) en cuerpos de agua del centro de México. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 9(2): 143–146.

Navarrete, S. N. A., G. R. Contreras, G. F. Elias and M. L. B. Rojas. 2004. Situación de *Girardinichthys viviparus* (especie amenazada) en los lagos de Chapultepec, Zumpango y Requena. Revista de Zoología 15: 1–6.

Neyra, G. L. and L. S. Durand. 1998. Biodiversidad. In CONABIO. La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Pp. 62-102.

Nikolsky, G.V. 1963. The Ecology of Fishes. Academic Press. New York. USA. 352 p.

Paulo-Maya, J. and P. Trujillo-Jiménez. 2000. Nueva especie de *Ilyodon* (Cyprinodontiformes:Goodeidae) de la cuenca del río Balsas, México. Revista de Biología Tropical 48: 465-472.

Quirós, R. 2007. Manejo y recuperación de lagos urbanos. Documento de Trabajo del Área de Sistemas de Producción Acuática No. 6. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina. 16 p.

Radda, A.C. and M. K. Meyer. 2003. Description of *Girardinichthys ireneae* sp.n. from Zacapu, Michoacan, Mexico, with remarks on the genera *Girardinichthys* Bleeker, 1860 and *Hubbsina* De Buen, 1941 (Goodeidae, Pisces). Die Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien, Serie B 104: 5–9.

Ricker, W. E. 1979. Growth rates and models. *In:* W.S. Hoar, D.J. Randall & J.R. Brett (eds.). Fish Physiology. Academic Press, London. VIII: 677-743.

Schlaepfer, A. M., F. D. Sax and D. J. Olden. 2011. The potential conservation value of non-native species. Conservation Biology 25 (3): 428–437. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2010.01646.x

Schueler, T. and J. Simpson. 2001. Why urban lakes are different. Urban Lakes Management 3: 747-750.

Sedeño-Díaz, J. E. and E. López-López. 2009. Threatened fishes of the world: *Girardinichthys viviparus* (Bustamante 1837) (Cyprinodontiformes:Goodeidae). Environmental Biology of Fishes 84: 11–12.

Soto-Galera, E. and J. M. Paulo. 1995. Peces dulceacuícolas Mexicanos. XI. *Allotoca dugesii* (Cyprinodontiformes: Goodeidae). Zoología Informa, IPN 31: 5-15.

van Aerle, R., T.J. Runnalls & C.R. Tyler. 2004. Ontogeny of gonadal sex development relative to growth in fathead minnow. Journal of Fish Biology 64: 355–369.

Williams, J. E. and R. R. Miller. 1990. Conservation status of the North American fish fauna in fresh water. Journal of Fish Biology 37 (Supplement A): 79-85.

Wootton, J.R. 1990. Ecology of teleost fishes. Fish and Fisheries Series 1. Chapman & Hall. New York. USA. 404 p.

CAPÍTULO 5

A PHYLOGENETIC STUDY OF THE MEMBERS OF THE MAPK FAMILY ACROSS VIRIDIPLANTAE

Data de aceite: 01/02/2022

José Manuel González-Coronel
Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Cuernavaca, Morelos, México

Gustavo Rodríguez-Alonso
Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Investigación en Dinámica Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Cuernavaca, Morelos, México

Ángel Arturo Guevara-García
Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Cuernavaca, Morelos, México

ABSTRACT: Protein phosphorylation is regulated by the activity of enzymes generically known as kinases. One of those kinases is Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), which operate through a phosphorylation cascade conformed by members from three related protein kinase families namely MAPK kinase kinase (MEKK), MAPK kinase (MEK), and MAPK; these three acts hierarchically. Establishing the evolution of these proteins in the plant kingdom is an interesting but complicated task because the current MAPK, MAPKK, and MAPKKK subfamilies arose from duplications and subsequent sub-functionalization during the early stage of the emergence of Viridiplantae. Here, an *in silico* genomic analysis was performed on 18 different plant species, which resulted in the identification of 70 genes not previously annotated as components of the MAPK family. Interestingly, a deeper analysis of the sequences encoded by such genes revealed the existence of putative domains not previously described as signatures of MAP kinases. Additionally, our analysis also suggests the presence of conserved activation motifs besides the canonical TEY and TDY domains, which characterize the MAPK family.
KEYWORDS: Viridiplantae, Phylogeny, MAPK gene family, Novel domains.

INTRODUCTION

Plants have evolved diverse and complex response mechanisms to contend against constantly changing environmental conditions. The perception of these conditions, together with the subsequent transduction and amplification of the generated signals, triggers cellular responses crucial to achieve optimal growth and development. Post-translational modifications (PTMs) constitute a major regulatory mechanism of protein activity [2,3]. PTMs regulate the activation or inhibition of protein activity, change the subcellular localization, alter protein stability, and promote or prevent trans-interactions [2–4]. PTMs are catalyzed by a wide variety of enzymes and are usually reversible [3,5,6]. Particularly, protein kinases regulate processes at the transcriptional,

translational, and post-translational level by catalyzing the addition of a phosphoryl group (PO_3^{2-}) from ATP to a substrate protein in specific amino acid residues usually serine (S), threonine (T) or tyrosine Y 6–8. Phosphorylation reactions depend on the catalytic activity of the kinase and the affinity, or protein-protein interaction capability, for their target proteins [6,7]

Versus other eukaryotic genomes, plants contain a larger number of protein kinases; for example, the *Arabidopsis thaliana* L. genome encodes approximately 1,200 kinases while the rice (*Oryza sativa* L.) genome contains ~1,400 kinase genes [8,9]. On the other hand, approximately 500 and 120 protein kinases are encoded in the *Homo sapiens* L. and *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen. genomes, respectively [10]271,853 high-quality sequence reads (5.11-fold coverage of the genome.

The MAPKs belong to the group of serine/threonine protein kinases that are responsible for transforming extracellular *stimuli* into a wide range of cellular responses [6,11]. MAPK signaling cascades are highly conserved in all eukaryotic organisms and are made up of three different gene families MAPK or MPK, MAPK kinase (MKK or MEK), and MAPKK kinases (MPKKK or MEKK) [6,8,12]. These components are sequentially activated by phosphorylation in the activation domain of their substrates [13,14]. The first component of the signaling cascade is the MEKK; it phosphorylates a pair of serine (S) and threonine (T) residues in the S/T-X_{3-5}-S/T domain of MEK proteins. Subsequently, MEKs activate MAPKs by phosphorylation of threonine (T) and tyrosine (Y) residues in the activation domain (T-X-Y) [3,15,16].

The modular and hierarchical arrangement of the MAPK signaling pathways is suitable for amplification and integration of signals at the cellular level [17,18]. Signaling cascades mediated by MAPKs coexist in many cells and are connected and regulated by feedback to at least some degree [3,11,12,17,19,20]. Due to the central role played by the MAP kinases in signal transduction and transmission, it is of great interest to classify the members of these families based on their phylogenetic relationships and their functional characteristics [17,21]. Despite the growing availability of plant genomes, the identification of MPKs has been limited to a small number of species, mainly from monocots [22–24], and dicots [13,16,23,25–30].

Members of the MAP kinase family have 11 canonical domains with an activation domain between domains VII and VIII. The activation domain of MAP kinases contains a pair of threonine and tyrosine residues, which are phosphorylated by a MEK protein [31]. Angiosperm MAPKs are classified into four groups (A-D) on the basis of their activation domain [16].

The molecular activity of MAP kinases has been seen in *Arabidopsis*. For example, the MEKK1-MKK4/5-MPK3/6 module participates in flagellin-triggered immune response [32]; and the MEKK1-MEK1/2-MPK4/6 module is activated in response to different types of stress [33]. The module MEKK4-MEK4/5-MPK3/6 was initially identified as a regulator of stomata development [34], and later suggested to participate in the regulation of root and embryo development [35]. In this work, MAPKs from seven species not previously analyzed were identified: *Amaranthus hypochondriacus* L., *Azolla filiculoides* [Lam.], *Isoetes echinospora*

Durieu, *Marchantia polymorpha* L., *Pinus taeda* L., and *Ostreococcus tauri* C. Courties & M.-J. Chrétiennot-Dinet, *Salvinia cucullata* [Bory.]; to provide a list of members of the MAPK family of each of the 18 analyzed species. A total of 70 novel sequences of MAPK proteins were obtained. In addition to a detailed study of the members of the MAP kinase family of the aforementioned species, a comparative analysis was also perfomed by adding the genes that code for the members of such families in representative species of the different plant lineage, including a chlorophyta (*Chlamydomonas reinhardtii* PA Dang.), a lycophyte (*Selaginella moellendorffii* P. Beauv.), two bryophytes (*Physcomitrella patens* [Hedw.] Bruch & Schimp., and *Sphagnum fallax* H. Klinggr.), a gymnosperm (*Picea abies* [L.] H. Karst.), and 00/00/00 0:00:00four angiosperm species: *Vitis vinifera* L., *Beta vulgaris* L., *Brachypodium distachyon* [L.] P. Beauv. and *Amborella trichopoda* Baill.

MATERIALS AND METHODS

Identification of MAPK genes in Viridiplantae

A BLASTP was carried out using the sequences of the MAPK proteins of *Arabidopsis thaliana* L. as a query to find putative orthologs in *Amaranthus hypochondriacus* L., *Amborella trichopoda* Baill., *Chlamydomonas reindhardtii* P.A. Daung., *Physcomitrella patens* [Hedw.] Bruch & Schimp., *Selaginella moellendorffii* P. Beauv., *Sphagnum fallax* H. Klinggr. (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html), *Azolla filiculoides* [Lam.], and *Salvinia cucullata* [Bory.] (https://www.fernbase.org/), *Marchantia polymorpha* L. (https://marchantia.info), *Oryza sativa* L. (http://www.plantgdb.org/OsGDB/), *Ostreococcus tauri* C. Courties & M.-J. Chrétiennot-Dinet. (https://genome.jgi.doe.gov/Ostta4/Ostta4.home.html), *Pinus taeda* L., *Picea abies* [L.] H. Karst. (http://congenie.org/), and *Vitis vinífera* L. (http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/) databases; considering an expected value (e-value) of $1x10^{-35}$ as a threshold. An additional search was carried out using hidden Markov models using HMMER 3.0 software [36]. Subsequently, the presence of the serine/threonine protein kinase domain (PF00069) was corroborated in the retrieved sequences.

The putative members of the MAPK family must contain the characteristic sequence [L/I/V/M]-[TS]-X-X-[L/I/V/M]-X-T-[K/R]-[W/Y]-Y-R-X-P-X-[L/I/V/M]-[L/I/V/M] including the T-X-Y activation domain [16,23]. The NCBI Conserved Domain Database (http://blast.ncbi.nlm.nih.go), ProtParam online software from the ExPASy suite (https://web.expasy.org/protparam/), and the InterProScan database (https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search) were used to validate the presence of domains in each of the sequences.

Multiple sequence alignment, phylogenetic, and gene structure analysis

Multiple sequence alignment was generated using the iterative refined method E-INS-i from MAFFT online software (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform; https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/) [37]huge numbers of biological sequences are available and the

need for MSAs with large numbers of sequences is increasing. To extract biologically relevant information from such data, sophistication of algorithms is necessary but not sufficient. Intuitive and interactive tools for experimental biologists to semiautomatically handle large data are becoming important. We are working on development of MAFFT toward these two directions. Here, we explain (i, and visualized with Jalview software v2.11.1.3 [38]. The IQtree 1.6.6 (http://www.iqtree.org/) and ProtTest (http://darwin.uvigo.es) software were used to determine the evolution substitution model of proteins to be used for the construction of the phylogenetic tree [39,40]. The phylogenetic analysis was performed using the complete sequence of each protein with the IQtree v1.6.6 software. The maximum-likelihood algorithm was used. The tree topology was statistically tested with the bootstrap method with 1,000 iterations. The tree topology was visualized in the iTOL software v5.7 [41].

Identification of novel domains and protein structure prediction

MEME-suite software v5.2.0 [42] was used to identify the canonical and novel MAPK domains. MEME was run with default parameters and a predefined motif length of eight to 12–15 residues. PhosphoSVM software [43] was used to predict phosphorylation of the novel domains. The protein logos were performed with WebLogo software v2.8.2 [44]

The protein structure was predicted with the I-Tasser software v5.1 [1] and visualized in the PyMol software v2.4.1 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.). The MPK6 crystal structure (PDB id: 5ci6) [45] was used as a template for structure modelling. Figure composition was performed using the InkScape software v1.0 (https://inkscape.org/es/).

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and nomenclature

MAP kinases are of paramount importance for plant development and stress response [3]. The partial redundancy of this protein superfamily, the high sequence similarity among homologs, and the expansion of the gene family in diverse plant species, have hindered the evolutionary studies of MAPKs. To provide a comprehensive phylogenetic analysis of MAPK proteins, a genome-wide identification of MAPK genes was performed for 18 selected species, spanning the major clades of Viridiplantae. Our analysis includes chlorophyta (*C. reindhardtii*, and *O. tauri*), bryophytes (*M. polymoprpha*, *P. patens*, and *S. fallax*), lycophyte (*S. moellendorffii*), seedless vascular plants (*A. filiculoides*, *I. echinospora*, and *S. cucullata*), gymnosperms (*P. taeda* and *P. abies*) and angiosperms. For the last clade we include the basal angiosperm *Amborella trichopoda*, as well as monocotyledonous (*B. dystachion*, and *O. sativa*) and dicotyledoneous species (*A. hypochondriacus*, *A. thaliana*, *B. vulgaris*, and *V. vinifera*). MAPK genes were identified through a combined approach of

homology identification and hidden Markov models (Table 1).

	Specie	Lineage	MAPKs gene number
1	*Arabidopsis thaliana* L.	Angiosperm (Eudicot)	20
2	*Amaranthus hypochondriacus* L.	Angiosperm (Eudicot)	12
3	*Beta vulgaris* L.	Angiosperm (Eudicot)	7
4	*Vitis vinifera* L.	Angiosperm (Eudicot)	14
5	*Brachypodium distachyon* [L.] P. Beauv.	Angiosperm (Monocot)	14
6	*Oryza sativa* L.	Angiosperm (Monocot)	15
7	*Amborella trichopoda* Baill.	Angiosperm (Basal)	8
8	*Picea abies* [L.] H. Karst.	Gymnosperm	11
9	*Pinus taeda* L.	Gymnosperm	12
10	*Azolla filiculoides* [Lam.]	Pteridophyta	15
11	*Salvinia cucullata* [Bory.]	Pteridophyta	14
12	*Isoetes echinospora* Durieu.	Lycophyta	8
13	Selaginella moellendorffii	Lycophyta	5
14	*Sphagnum fallax* H. Klinggr.	Bryophyta	8
15	*Marchantia polymorpha* L.	Bryophyta	6
16	*Physcomitrella patens* [Hedw.] Bruch & Schimp.	Bryophyta	11
17	*Chlamydomonas reindhardtii* P. A. Dang.	Algae	6
18	*Ostreococcus tauri* C. Courties & M.-J. Chrétiennot-Dinet	Algae	3

Table 1. Number of MAPK genes present per genome (specie).

A total of 189 genes were identified: 119 previously described and 70 not previously annotated as member of the MAPK family. Although previous efforts to reconstruct the evolutionary history of MAPK genes have been made, ortholog identification on early divergent plant clades has remained elusive [13]. Moreover, independent studies in species such as *A. thaliana*, *O. sativa*, and *P. trichocarpa*, has led to different nomenclature and classification system for MAPKs [16].

Here, a nomenclature system was stablished in which each of the genes were named using a two-letter code corresponding to the first letter from the genus and species. This two-letter code remained in: Af (*Azolla filiculoides*), Ah (*Amaranthus hypochondriacus*), At (*Arabidopsis thaliana*), Bv (*Beta vulgaris*), Bd (*Brachypodium distachyon*), Cr

(*Chlamydomonas reindhardtii*), Ie (*Isoetes echinospora*), Mp (*Marchantia polymorpha*), Ot (*Ostreoccocus tauri*), Os (*Oryza sativa*), Pp (*Physcomitrella patens*), Pa (*Picea abies*), Pt (*Pinus taeda*), Sc (*Salvinia cucullata*), Sf (*Sphagnum fallax*), Sm (*Selaginella moellendorffii*), and Vv (*Vitis vinífera*); to distinguish *Amborella trichopoda* from *A. thaliana*, the second letter of both genus and species was added to the first one (i.e., Amtr). Next to this letter code the acronym MPK (from **M**itogen-activated **P**rotein **K**inase) was included along with a and a number referring to its most likely ortholog in *Arabidopsis thaliana* L. [46]. Likewise, when two or more of the identified sequences have the same putative ortholog in *Arabidopsis*, they were distinguished by adding a letter in alphabetical order. This is the case of the *P. taeda* sequences PITA_000030510, PITA_000007088 and PITA_000001460, which, were putative orthologs of AtMPK5 and were renamed as PtMPK5a, PtMPK5b and PtMPK5c, respectively.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF MAP KINASES

A multiple sequence alignment of the retrieved MAP kinases sequences was built and used to reconstruct the molecular phylogeny of MAP kinases. The alignment shows a high degree of conservation in the sequences that correspond to the 11 characteristic MAPK domains; moreover, all analyzed sequences contain the TXY-activation domain. A maximum likelihood tree was constructed for the MAP kinase-retrieved sequences; the tree was rooted with the *Saccharomyces cerevisiae* Fus3 protein that was selected as an outgroup given its similarity to Viridiplantae MAPKs. Previous studies classified the *Arabidopsis* MAPK genes into four groups (A, B, C and D) according to their sequence similarity and the presence of the TDY or TEY phosphorylation motifs [16]. The resulting ML tree topology displays five well-supported clades with bootstrapping values >90.0% out of 1000 replicates; thus, we support the previous suggestion to consider another group to classify MAP kinases (A-E); the existence of an additional group F has been refuted [47] (Figure 1).

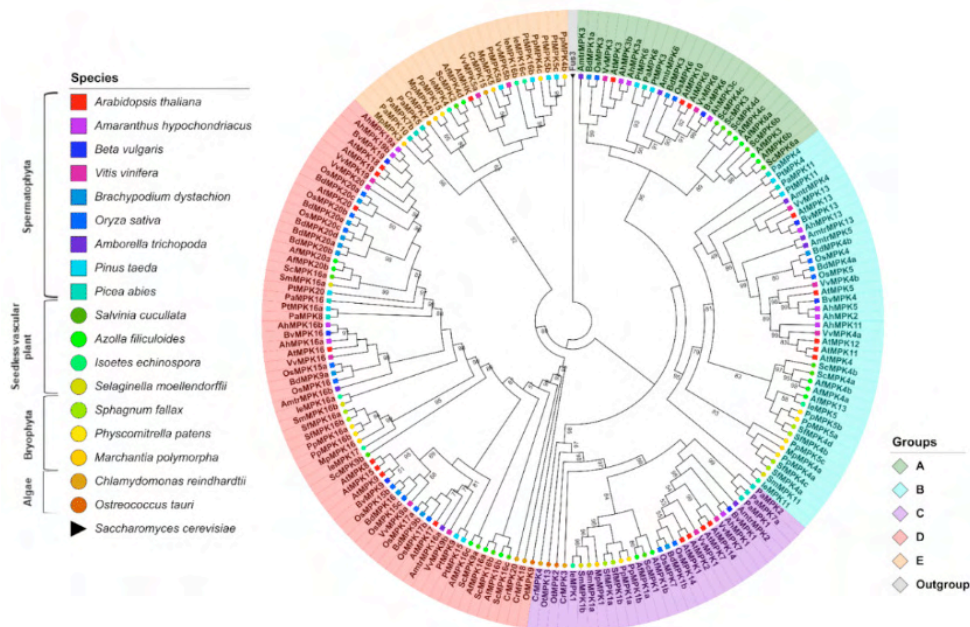



Figure 1. Maximum-likelihood tree reconstructed from amino acid sequences. The tree was rooted with the Fus3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. Bootstrap values from 1,000 replicates are indicated at nodes with support values >49%. Each MAPK group is indicated with a distinctive color. Different species are indicated with shapes and colors.

The MAPK group A contains sequences retrieved from pteridophytes, gymnosperms and angiosperms. Surprisingly, no group A MAPKs were identified in the lycophytes, bryophytes or algae species analyzed. This observation suggests that group A MAPKs arose in the Euphyllophyte clade after the separation from the lycophytes, which occurred ca. 420 million years ago (MYA) [48,49] (Figure 1). AtMPK3 and AtMPK6 both belong to group A MAPKs and are the two most widely studied MAPK proteins. Together with their putative orthologs in other plant species, these species have been involved in responses to biotic and abiotic stresses [20,50,51]. Members of group B have been involved in cell division and in the responses to biotic and abiotic stress; in particular, the loss of function mutant *mpk4* of *A. thaliana* leads to a constitutive phenotype of systemic acquired resistance [52,53]. Some members such as AtMPK13, another group B MAPK, are activated through the cell cycle, and they are located specifically in the phragmoplast during telophase [54].

Groups A and B are sister clades according to the tree topology; this observation together with its absence in algae species suggests that these MAPK groups were the last to be acquired (Figure 1). Group C MAPKs are less characterized than MAPKs from groups A and B, although the expression and activity of AtMPK7 (group C) is regulated by the circadian cycle [55]. Group D makes up the largest group of MAPK proteins including 61 sequences. This is characterized by the sequence TDY in its activation domain; in

addition, group D MAPKs have an extended C-end compared to proteins from the groups A-C. In *Arabidopsis*, the AtMPK8 protein from group D is involved in seed germination and dormancy [56].

Finally, members of group E are known as **M**apk-**h**omologous **k**inases (MHKs) and may contain the TEY or TDY sequence and even some non-canonical motif in the activation domain [16]. It remains a matter of debate whether group E MAPKs constitute functional MAPKs given their similarity to cyclin-dependent kinases (CDKs), even though their biochemical properties are largely unknown.

MAPK ANALYSIS

Of the genomes under study, the angiosperm clade has the highest number of MAPK members per family, with *A. thaliana* having the highest number of genes encoding MAPKs (20) followed by rice (*O. sativa*) and grape (*Vitis vinifera*) with 15 and 14 genes, respectively. In addition, species *A. filiculoides* and *S. cucullata* in the pteridophytes clade have 15 and 14 genes, respectively. The large number of MAPK genes in Azolla and Salvinia might be a result of whole genome duplication events in the Salviniales [57]. On the other hand, *O. tauri* in the algae group has the lowest number of genes of the analyzed species (3), while *C. reindhardtti* has 6. Bryophytes have an increase in the number of MAPK genes with respect to that of algae. The members of this clade, *P. patens*, *S. fallax*, and *M. polymorpha* contain 11, 8, and 6 genes, respectively. The MAPK gene family expansion in bryophytes is congruent with the expansion of gene families in land plants upon terrestrialization and might be associates with plant facing new types of stress, such as dehydration, gravity, exposure to ultraviolet light, etc. after land colonization [58,59] (Figure 1; Table 1).

ANALYSIS OF MOTIFS AND DOMAINS CONSERVED IN THE MAPK FAMILY

MAPKs are characterized by the presence of multiple domains. Eight domains, named I-V, VIa, VIb, and VII are distributed towards the N-terminal preceding the activation domain. Towards the C-terminal end of the activation domain, there are five other domains previously described as typical of MAPKs. Domain VIII, IX, and X precede the CD domain; finally, the XI domain is localized around 30 amino acids after the CD domain (Table 2) [31,33]. We used the MEME's bioinformatics software to address domain conservation among the identified MAPK sequences.

Domain	Consensus sequence
I	[V/P]-[I/V]-G-[K/R]-G-[S/A]-Y-G-[V/I]-V-C-S-A
II	E-X-V-A-I-K-K-I-X-[N/D]-[A/V/I]-F-[E/D]-[N/H]-X_2-D-A
III	R-[T/I]-L-R-E-[I/L]-K-L-L-R-[H/L]-[L/M]-[R/D]
IV	P-X-[R/K]-X_2-F-X-D-[V/I]-Y
V	V-[F/Y]-E-L-M-[E/D]-[T/S]-D-L-H-Q-[V/I]-I-[K/R]
VIa	[F/Y]-F-L-Y-Q-[L/I/M]-L-R-[G/A]-L-K-Y
VIb	H-[S/T]-A-N-[V/I]-[L/F/Y]-H-R-D-K-L-P-[K/S]-N-[L/I]-L-[A/L]-N
VII	C-[D/K]-L-K-I-[C/A]-D-F-G-L-A-R-[V/T]
VIII	[V/A]-T-R-W-Y-R-A-P-E-L-[L/C]-[L/G]-[S/N]
IX	A-I-D-[I/V/M]-W-S-[V/I]-G-C-I-F-[A/M]-E-[L/I/M]-[L/M]
X	P-[L/I]-F-P-G-X_3-[V/L]-X-Q-L-X-L-[I/M]-T-[D/E]
XI	F-D-P-X_2-R-[I/P]-[T/S]-[A/V]-X-[E/D]-A-L-X-[H/D]-P-Y-[F/L]
CD	L-H-D-X_2-D-E-P

Table 2. Consensus sequences of the conserved domains in MAPKs.

Of the 90 sequences analyzed that belong to angiosperms, 83 present all the canonical domains. The remaining seven (2 sequences from *A. trichopoda* and 5 from *V. vinifera*) lack at least one domain: VvMPK1 and VvMPK7 (domains I-IV), VvMK5a and VvMPK5b (III-V and VIa), VvMPK20 (I -III), AmtrMPK5 (IV), and AmtrMPK16a (XI). The fact that the vast majority of sequences belonging to angiosperms contain all the canonical domains could reflect a bias because this clade is the most studied. Most of the sequences of the analyzed angiosperm species lack multiple domains. In *P. taeda*: PtMPK5a (III-V, and VIa), PtMPK5b (III-V, VIa, and IX), PtMPK5c (III-V, VIa, and IX-X), PtMPK11 (I -III), PtMPK16 (II-V, and VIa), and PtMPK20 (IX-X). In *P. abies*: we note PaMPK2 (I-VII), PaMPK4a (V), PaMPK7a (VIb and VII-XI), PaMPK7b and PaMPK10 (III, V, and VIa), PaMPK11 (I-III, and V), and PaMPK16 (IX and XI). Eight of these sequences belong to group E MAPKs, which include MHKs and whose inclusion as MAPKs, as already mentioned, has been debated due to their sequence similarity to CDKs [12]. Whether group E proteins function as MAPKs has been poorly studied, although an ortholog of these proteins in the fungus *Ustilago maydis* is activated by phosphorylation by a MAPKK and contains the activation motif TXY [60]. This observation supports the hypothesis that group E MAPKs should be regarded as a subfamily of MAPKs. In fern species, the AfMPK6b and AfMPK16b sequences of *A. filiculoides* lack domain I and domain IX, respectively. The AfMPK4d sequence lacks domains IV and IX. On the other hand, in *S. cucullata*, the ScMPK6b sequence lacks the V,

VIa and VIb domains; the ScMPK16c sequence lacks domain XI. Domains III, IV and VII are absent in the ScMPK2 sequence. In the case of *I. echinospora*, the sequence IeMPK4 lacks I-V domains while IeMPK7 and IeMPK11 lacks domain XI.

The lack of several domains in the angiosperm and fern sequences is due to the fact that the genomes of these species are still fragmented, in the databases. Some of the ORFs that are found as hits might come from fragmented sequences and therefore the sequences corresponding to certain domains are missing. In the bryophytes *M. polymorpha*, *S. fallax*, and *P. patens*, we see MpMPK3 and MpMPK5 (III-V, and VIa), MpMPK4b (III and IV), PpMPK4b (II-IV, VIa, and IX), PpMPK4c (III-V, VIa, and IX), PpMPK15 (III, IV, VIa, and IX), PpMPK16a, and PpMPK16b (IX). For their part, the three sequences identified here from the alga *O. tauri* lack domain IV. Thus, the results of this analysis allow us to suggest that the presence of the activation motif (T-X-Y) together with five domains (II, III, V, and VII) located towards the N-terminal end of the activation domain and present in all the analyzed sequences are sufficient to identify MAP kinases from any plant species. In addition to this, the presence of domains VIII-XI in most Viridiplantae MAPK sequences suggests that these domains are of critical importance for maintaining either the function or structure of these proteins.

MAPK proteins contain a T-X-Y motif whose phosphorylation leads to MAPK activation [16]. The Viridiplantae multiple sequence alignment shows that all analyzed species contain the canonical activation domain in the form of T-E-Y (98 sequences), T-D-Y (77 sequences), and T-S-Y (1 sequence). The alignment also shows the presence of non-canonical activation domains including M-E-Y (2 sequences), T-E-M (2 sequences), T-H-E (4 sequences), T-H-L (1 sequence), T-H-Q (1 sequence), T-K-T (2 sequences), T-Q-M (1 sequence), and T-S-Y (1 sequence). The distribution of these activation domains on the MAPK phylogeny shows that the T-E-Y domain is present in MAPKs from groups A, B, C, and E, while the T-D-Y is present on the D and E groups. The activation domain contained in group E sequences exhibits the highest variability, which is especially evident on Bryophyta including T-D-Y, T-H-E, T-K-T, and T-Q-M variants (Table 3).

	Motif	Group A	Group B	Group C	Group D	Group E
Activation domain sequence	TEY	27	40	28	-	3
	TDY	-	-	-	58	9
	MEY	-	OsMPK5 BdMPK4a	-	-	-
	TDG	-	-	PaMPK7a	-	-
	TEM	-	-	-	-	PaMPK5 PaMPK7b

Activation domain sequence					
THE	-	-	-	-	PpMPK4b PpMPK4c PtMPK5b PtMPK5c
THL	-	-	-	-	PtMPK16b
THQ	-	-	-	-	IeMPK16b
TKT	-	-	-	-	IeMPK16c MpMPK3
TQM	-	-	-	-	PamK10
TSY	-	-	OtMPK2	-	-
Total	27	42	30	58	23

Table 3. Distribution of the different activation domains in MAPK proteins.
(**Bd**) *B. dystachion*; (**Ie**) *I. echinospora*; (**Mp**) *M. polymorpha*; (**Os**) *O. sativa*; (**Ot**) *O. tauri;*
(**Pa**) *P. abies*; (**Pt**) *P. taeda.*

In addition to the 11 characteristic domains, MAP kinases also contain the sequence (L/H)-D-X_2-D-E-P known as the common docking domain (CD domain) [20]. Our results show that the CD domain is present in most proteins from the A, B, and C MAPK group; although it is also present in a few sequences from the groups D and E, it is generally absent in proteins from these clades. The CD includes a motif involved in recognition and binding to MAPK substrates, as well as in protein-protein interaction with MEKs. The adjacent aspartate (D) and glutamate (E) residues in the CD, are essential for interaction with the basic residues lysine (K) and arginine (R), located in the binding site of MEK proteins [61]. It remains to be experimentally demonstrated whether the absence of the CD domain has any impact on the function of these group D and E MAPKs either for interaction and phosphorylation by MEKs or in MAPKs substrate specificity.

Identification of novel and distinctive domains for each group of MAPKs

The domain analysis of the retrieved sequences suggests the existence of six novel domains, named 12-17 (Figure 2). The presence of these domains might predict the group to which a MAPK protein belongs facilitating MAPK identification during genome or transcriptome annotation. The consensus sequence of such domains consists of 12-17 amino acid residues (Table 4).

Domain	Consensus sequence
12	G-N-X-F-E-V-[T/S]-X-K-Y
13	Y-X-[M/L]-W-[Q/R]-[T/S]-X-F-E-I-D-T-K-Y
14	H-[P/K]-D-I-V-E-[I/V/K]-[K/L]-[I/H/N]-[I/K]-[M/L]-L-P
15	M-L-X-F-[D/N]-P-X_2-R-I-[T/S]
16	E-[L/V]-[I/L]-G-[T/S]-P-X-[E/D]-X-D-L-X-F-[L/I/V]
17	A-[R/K]-[R/K]-Y-[L/I/V]-X_2-[L/M]-[R/P]-X_3-[P/R/K]-X-[P/S]

Table 4. Consensus sequences of the novel domains discovered in MAPKs.

Domain 12 is located approximately 15 residues before domain I from group A and B proteins. It is also present in OtMPK13 from *O. tauri*. Domain 13 is also located towards the N-terminus end of domain I but is only present in the proteins from group C therefore providing a signature for group C MAPKs. Domain 14 is located between domains II and III and typifies proteins from group D. Domains 15–17 are distributed towards the C-terminal end and, if present, they are always located before the CD domain between the canonical domains X and XI. Domain 15 is present in proteins from the B and E group with the sole exception of PtMPK16b from group E. Except VvMPK3 and VvMPK6 that belong to group A, domain 16 is only located in group B MAPKs. Domain 17 is present in most proteins except those in groups C and E. Interestingly, domain 17 is also present in the Fus3 kinase of *S. cerevisiae* this prompts the hypothesis that this domain was present in the ancestral MAPK sequences and was lost in groups C and E (Figure 2).

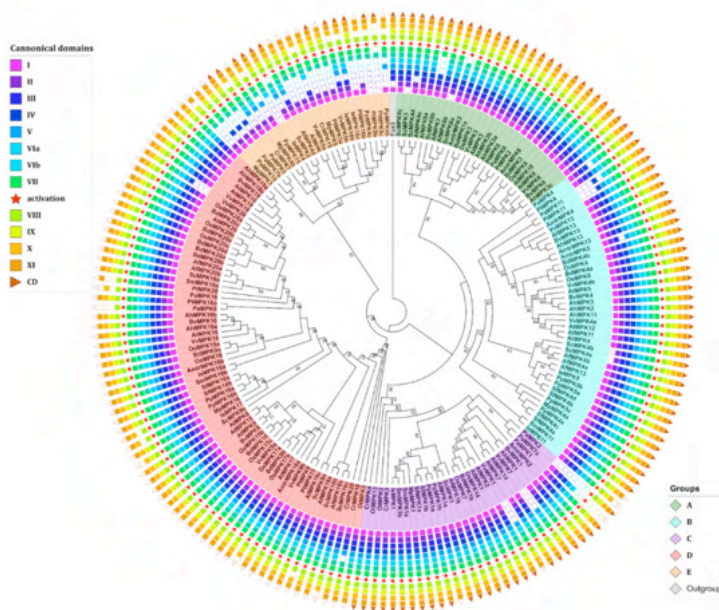



Figure 2. Phylogenetic analysis and identification of novel domains in MAPKs. The analysis of novel domains was performed with the MEME suite[42]. The distribution of the novel domains is group specific and could, therefore, facilitate MAPK identification and annotation. Sequence nomenclature follows a two-letter code to indicate genus and species (see text).

The conservation and distribution of these novel MAPK domains in a group-specific manner could suggest that they are involved in either maintaining the structure of MAPKs or in fine-tuning the selectivity towards substrates or protein interactors. This hypothesis is supported by homology structure prediction of selected MAPKs, which shows that domains 12, 13, 15, 15, and 17 are exposed to the solvent and could therefore provide an interaction surface. Meanwhile domain 14 is in a pocket (Figure 3). Moreover, a computational prediction of phosphorylation sites suggests that domains 15 and 16 contain amino acid residues susceptible to phosphorylation, whether these residues are indeed phosphorylated or if the identified novel domains are of relevance for the MAPKs structure and function remains to be experimentally demonstrated and extends beyond the scope of this study.

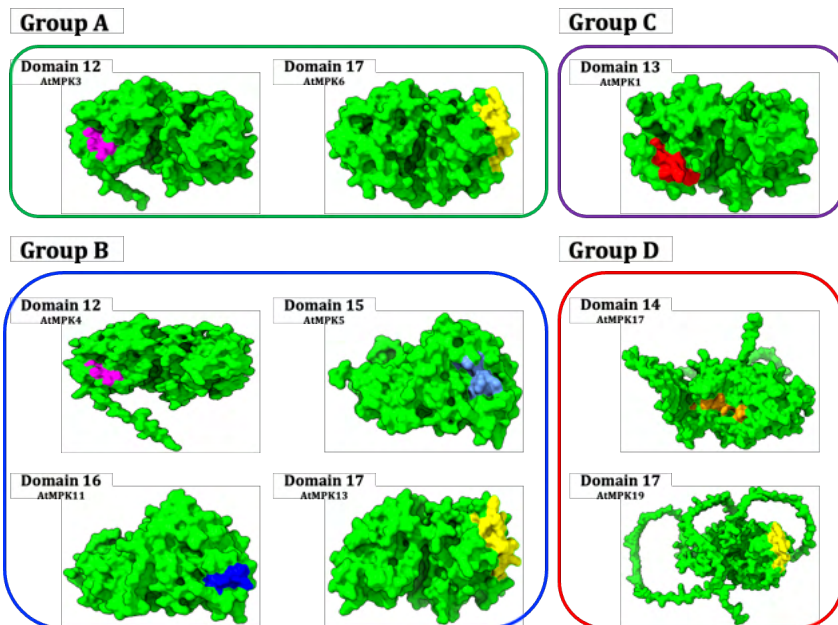



Figure 3. Molecular structure of plant MAPKs showing putative localization of the novel domains. The protein structures were obtained from homology modelling and visualized in PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.). Each domain is presented as a sequence logo, obtained from the multiple sequence alignment of all the retrieved sequences [44]graphical representations of the patterns within a multiple sequence alignment. Sequence logos provide a richer and more precise description of sequence similarity than consensus sequences and can rapidly reveal significant features of the alignment otherwise difficult to perceive. Each logo consists of stacks of letters, one stack for each position in the sequence. The overall height of each stack indicates the sequence conservation at that position (measured in bits, and highlighted in the protein structure with a distinctive color.

CONCLUSIONS

MAPKs are among the oldest signal transduction pathways. In plants, they are involved in the regulation of various physiological processes such as hormone signaling [15,46] and respond to different types of stress [6,16–18,20]. Several members of the MEK family can act as convergence points of a great variety of signals and stimuli with an extraordinary high substrate specificity towards a MAPK. MAPKs on the other hand seem to function as divergence points [26]. Despite their involvement in several biological processes and the previous efforts to elucidate the evolutionary paths of MAPKs diversification in plants such convergence has been limited by the intrinsic properties of the MAPK signaling cascade components, i.e., its functional redundance, high similarity at the amino acid level, gene family expansion and contraction in several plant taxa, and the availability of sequenced plant genomes.

Here, the phylogenetic relationships between MAPKs from 18 Viridiplantae species were analyzed. The analyzed species were selected to span the major Viridiplantae clades

ranging from Chlorophyta, i.e., green algae, up to angiosperms. This allows for a comprehensive and genome wide exploration of MAPKs across Viridiplantae, and the consequent reconstruction of gene of gene phylogenies to assess the diversification of the MAPK signaling cascades in plants. The need to implement a heuristic nomenclature system has become more evident with the identification of a large number of MAPK family genes. In addition, the system proposed by Hamel *et al*. (2006) named MAPK genes according to their Arabidopsis orthologs and signature sequences that typify MAPK genes and has been extended. The proposed nomenclature might be used as a practical tool to aid in the identification of novel MAPK genes in additional plant genomes and even during genome annotation projects. The reconstructed ML trees exhibit a well resolved and supported topology; therefore, it is useful to recognize the most likely Arabidopsis ortholog of the retrieved MAPK sequences.

Orthology-based nomenclature systems provide functional insights for each MAPK clade [15,27]; thus, some of the novel domains identified in this work could be correlated to substrate, activator, or inhibitor specificity as well as to protein-protein interactions. It is likely that some of the conclusions reached, or the number of identified sequences in some of the analyzed species, might need to be adjusted as new genome versions are updated or reannotated. Also, the inclusion of more genomes specifically from plant clades that are still underrepresented such as lycophyte or gymnosperm might help to refine the reconstructed phylogenies. International collaborative projects such as the 10KP will overcome this gap in the near future [62].

FUNDING

This work was supported by UNAMDGAPA-PAPIIT (grant IN209420 to AAGG), PRODEP (postdoctoral fellowship granted to GRA), and CONACYT-Me xico (fellowship 481085 to JMGC).

REFERENCES

1. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc. 2010;5(4):725–38.

2. Olsen JV, Mann M. Status of Large-scale Analysis of Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics. 2013;12(12):3444–52.

3. Bigeard J, Hirt H. Nuclear Signaling of Plant MAPKs. Front Plant Sci. 2018;9:469.

4. Bigeard J, Colcombet J, Hirt H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). Molecular Plant. 2015;8(4):521–39.

5. Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K. Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. Plant J. 2000;24(5):655–65.

6. Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N. Signaling through MAP kinase networks in plants. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2006;452(1):55–68.

7. Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. Trends in Plant Science. 2004;9(5):236–43.

8. The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature. 2000;408(6814):796–815.

9. Dardick C, Chen J, Richter T, Ouyang S, Ronald P. The Rice Kinase Database. A Phylogenomic Database for the Rice Kinome. Plant Physiol. 2007;143(2):579–86.

10. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome. Science. 2001;291(5507):1304–51.

11. Colcombet J, Hirt H. *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. Biochemical Journal. 2008;413(2):217–26.

12. Dóczi R, Ökrész L, Romero AE, Paccanaro A, Bögre L. Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. Trends in Plant Science. 2012;17(9):518–25.

13. Hamel L-P, Nicole M-C, Sritubtim S, Morency M-J, Ellis M, Ehlting J, et al. Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. Trends in Plant Science. 2006;11(4):192–8.

14. Kersten B, Agrawal GK, Durek P, Neigenfind J, Schulze W, Walther D, et al. Plant phosphoproteomics: An update. Proteomics. 2009;9(4):964–88.

15. Wu P, Wang W, Li Y, Hou X. Divergent evolutionary patterns of the MAPK cascade genes in Brassica rapa and plant phylogenetics. Hortic Res. 2017;4(1):17079.

16. (Kazuya Ichimura et al.) MG, Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, et al. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends in Plant Science. 2002;7(7):301–8.

17. Chardin C, Schenk ST, Hirt H, Colcombet J, Krapp A. Review: Mitogen-Activated Protein Kinases in nutritional signaling in Arabidopsis. Plant Science. 2017;260:101–8.

18. Luo J, Wang X, Feng L, Li Y, He J-X. The mitogen-activated protein kinase kinase 9 (MKK9) modulates nitrogen acquisition and anthocyanin accumulation under nitrogen-limiting condition in Arabidopsis. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017;487(3):539–44.

19. Tena G, Asai T, Chiu W-L, Sheen J. Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Current Opinion in Plant Biology. 2001;4(5):392–400.

20. Jonak C. Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. Current Opinion in Plant Biology.2002;5(5):415–24.

21. Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, et al. MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. Genes & Development. 2009;23(1):80–92.

22. Rao KP, Richa T, Kumar K, Raghuram B, Sinha AK. In Silico Analysis Reveals 75 Members of Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Gene Family in Rice. DNA Research. 2010;17(3):139–53.

23. Wang J, Pan C, Wang Y, Ye L, Wu J, Chen L, et al. Genome-wide identification of MAPK, MAPKK, and MAPKKK gene families and transcriptional profiling analysis during development and stress response in cucumber. BMC Genomics. 2015;16(1):386.

24. Chen L, Hu W, Tan S, Wang M, Ma Z, Zhou S, et al. Genome-Wide Identification and Analysis of MAPK and MAPKK Gene Families in Brachypodium distachyon. Wu K, editor. PLoS ONE. 2012;7(10):e46744.

25. Kong F, Cao M, Li N, Sun B, Sun M, Mao Y. Genome-Wide Identification, Phylogeny, and Expressional Profiles of the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) Gene Family in Pyropia yezoensis. Front Mar Sci. 2020;7:193.

26. Liu Y, Zhang D, Wang L, Li D. Genome-Wide Analysis of Mitogen-Activated Protein Kinase Gene Family in Maize. Plant Mol Biol Rep. 2013;31(6):1446–60.

27. Çakır B, Kılıçkaya O. Mitogen-activated protein kinase cascades in Vitis vinifera. Front Plant Sci [Internet]. el 22 de julio de 2015 [citado el 8 de noviembre de 2021];6. (http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00556/abstract)

28. Jiang M, Chu Z. Comparative analysis of plant MKK gene family reveals novel expansion mechanism of the members and sheds new light on functional conservation. BMC Genomics. 2018;19(1):407.

29. Singh A, Nath O, Singh S, Kumar S, Singh IK. Genome-wide identification of the MAPK gene family in chickpea and expression analysis during development and stress response. Plant Gene. 2018;13:25–35.

30. Zhang S, Xu R, Luo X, Jiang Z, Shu H. Genome-wide identification and expression analysis of MAPK and MAPKK gene family in Malus domestica. Gene.2013;531(2):377–87.

31. Hirt H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. Trends in Plant Science. 1997;2(1):11–5.

32. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, et al. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature. 2002;415(6875):977–83.

33. Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Dóczi R, Ichimura K, Shinozaki K, et al. The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. Molecular Cell.2004;15(1):141–52.

34. Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S. Stomatal Development and Patterning Are Regulated by Environmentally Responsive Mitogen-Activated Protein Kinases in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 2007;19(1):63–73.

35. López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, et al. Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. Journal of Experimental Botany. 2014;65(1):169–83.

36. Johnson LS, Eddy SR, Portugaly E. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. BMC Bioinformatics. 2010;11(1):431.

37. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Briefings in Bioinformatics. 2019;20(4):1160–6.

38. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. Bioinformatics. 2009;25(9):1189–91.

39. Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics. 2005;21(9):2104–5.

40. Trifinopoulos J, Nguyen L-T, von Haeseler A, Minh BQ. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Res. 2016;44(W1):W232–5.

41. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. Nucleic Acids Research. 2019;47(W1):W256–9.

42. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Research. 2009;37(Web Server):W202–8.

43. Dou Y, Yao B, Zhang C. PhosphoSVM: prediction of phosphorylation sites by integrating various protein sequence attributes with a support vector machine. Amino Acids.2014;46(6):1459–69.

44. Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: A Sequence Logo Generator. Genome Res. 2004;14(6):1188–90.

45. Wang B, Qin X, Wu J, Deng H, Li Y, Yang H, et al. Analysis of crystal structure of Arabidopsis MPK6 and generation of its mutants with higher activity. Sci Rep. 2016;6(1):25646.

46. Nicole M-C, Hamel L-P, Morency M-J, Beaudoin N, Ellis BE, Séguin A. MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases. BMC Genomics. 2006;7(1):223.

47. Mohanta TK, Arora PK, Mohanta N, Parida P, Bae H. Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. BMC Genomics. 2015;16(1):58.

48. Raven JA, Edwards D. Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. Journal of Experimental Botany. 2001;52(suppl 1):381–401.

49. Dolan L, Scheres B. Root pattern: Shooting in the dark? Seminars in Cell & Developmental Biology.1998;9(2):201–6.

50. Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, et al. The Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade MKK3–MPK6 Is an Important Part of the Jasmonate Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 2007;19(3):805–18.

51. Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(6):2940–5.

52. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal Transduction through MAP Kinase Cascades. En: Advances in Cancer Research [Internet]. Elsevier; 1998 [citado el 22 de noviembre de 2021]. p. 49–139. (https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X08607654)

53. Rasmussen MW, Roux M, Petersen M, Mundy J. MAP Kinase Cascades in Arabidopsis Innate Immunity. Front Plant Sci [Internet]. 2012 [citado el 8 de noviembre de 2021];3. (http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2012.00169/abstract)

54. Calderini O, Bogre L, Vicente O, Binarova P, Heberle-Bors E, Wilson C. A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. Journal of Cell Science. 1998;111(20):3091–100.

55. Schaffer R, Landgraf J, Accerbi M, Simon V, Larson M, Wisman E. Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in Arabidopsis. The Plant Cell. 2001;13(1):113–23.

56. Zhang W, Cochet F, Ponnaiah M, Lebreton S, Matheron L, Pionneau C, et al. The MPK 8- TCP 14 pathway promotes seed germination in Arabidopsis. Plant J.2019;100(4):677–92.

57. Li F-W, Brouwer P, Carretero-Paulet L, Cheng S, de Vries J, Delaux P-M, et al. Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. Nature Plants. 2018;4(7):460–72.

58. Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu S-H. Evolution of Gene Duplication in Plants. Plant Physiol. 2016;171(4):2294–316.

59. Van de Peer Y, Mizrachi E, Marchal K. The evolutionary significance of polyploidy. Nat Rev Genet. 2017;18(7):411–24.

60. Garrido E, Voß U, Müller P, Castillo-Lluva S, Kahmann R, Pérez-Martín J. The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. Genes Dev. 2004;18(24):3117–30.

61. Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. Nat Cell Biol. 2000;2(2):110–6.

62. Cheng S, Melkonian M, Smith SA, Brockington S, Archibald JM, Delaux P-M, et al. 10KP: A phylodiverse genome sequencing plan. GigaScience (https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giy013/4880447).

CAPÍTULO 6

Haemophilus influenzae NO TIPIFICABLE CAUSANTE DE NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD COMPLICADA: REPORTE DE UN CASO

Data de aceite: 01/02/2022
Data de submissão: 20/01/2022

Muñiz Gallardo Serguei
Departamento de Agentes Biológicos, Facultad de Medicina Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla, México

Martínez García Julieta
Departamento de Agentes Biológicos, Facultad de Medicina Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla, México

Nájera Hernández Salustio
Servicio de Pediatría, Infectología y Epidemiología del Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Maza". Tuxtla Gutiérrez
Chiapas, México

Gutiérrez Pastrana Viridiana Ofelia
Servicio de Pediatría, Infectología y Epidemiología del Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Maza". Tuxtla Gutiérrez
Chiapas, México

Martínez Domínguez Rosa Aurora
Servicio de Pediatría, Infectología y Epidemiología del Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Maza". Tuxtla Gutiérrez
Chiapas, México

Beltrán Silva Sandra Luz
Servicio de Pediatría, Infectología y Epidemiología del Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Maza". Tuxtla Gutiérrez
Chiapas, México

Adriana Meneses Ríos
Servicio de Pediatría, Infectología y Epidemiología del Hospital Chiapas nos une "Dr. Jesús Gilberto Gómez Maza". Tuxtla Gutiérrez
Chiapas, México

Lara Flores Norarizbeth
Departamento de Agentes Biológicos, Facultad de Medicina Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Puebla, México

RESUMEN: Hoy en día *Haemphilus influenzae* no tipificable es considerado como uno de los patógenos bacterianos más comunes causantes de neumonía en la población infantil. Presentamos el reporte de un caso de una lactante femenina con diagnóstico de derrame pleural derecho e Infección Respiratoria Aguda Grave. De acuerdo con estudios de laboratorio se decidió decide iniciar con doble antibioticoterapia, el cultivo del líquido pleural reporta crecimiento de Bacilos Gram negativos. Se mantiene la doble antibioticoterapia sustituyendo un medicamento con Vancomicina. Tras 24 días de hospitalización, la evolución fue satisfactoria con egreso de la paciente del nosocomio, con terapia pulmonar. Es importante la vigilancia de los síntomas

respiratorios en todos los niños, realizar cultivo y antibiograma para identificar el agente etiológico y determinar el tratamiento adecuado para una evolución exitosa del paciente.
PALABRAS CLAVE: *Haemophilus influenzae* no tipificable, Neumonía bacteriana, derrame pleural.

INTRODUCCIÓN

La neumonía es una enfermedad inflamatoria que afecta al pulmón. Se caracteriza por una acumulación de líquido en el alvéolo, lo que resulta en la obstrucción de la respiración normal. [1] Con más de 120,000 millones de episodios que ocurren en todo el mundo cada año, la neumonía es la principal causa de mortalidad infantil por enfermedades infecciosas, representa aproximadamente 1 millón de muertes anuales y afecta principalmente a niños en países en desarrollo. La mortalidad atribuida a la neumonía ha disminuido desde el año 2000, pero sigue siendo un importante problema de salud pública. [2] La etiología de la neumonía se atribuye cada vez más a múltiples organismos detectados mediante pruebas moleculares. El mayor uso de la vacuna antineumocócica conjugada (PCV) y la vacuna *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) ha cambiado la etiología de la neumonía, siendo *Staphylococcus aureus* y *H. influenzae* no tipificable (HiNT) los patógenos bacterianos más comunes, el virus sincitial respiratorio (VSR) como el más común de etiología viral, mientras que *Pneumocystis jirovecii* es la principal causa de neumonía fúngica en niños. [1,3, 15]

Haemophilus influenzae (Hi) es un cocobacilo gram-negativo restringido a humanos. Debido a la composición de la cápsula de polisacárido, se clasifica en cepas capsuladas divididas en seis serotipos (a-f), siendo el serotipo b el más virulento, y cepas no capsuladas o no tipificables (HiNT). Dado que la vacuna va dirigida a cepas con cápsula de serotipo b no tiene impacto en otros serotipos. Hoy en día, el *Haemophilus* encapsulado más común que causa infecciones invasivas es el serotipo F (HiF). Sin embargo, una incidencia predominante de infecciones por *Haemophilus* es causada por cepas no tipificables.[4]

HiNT es comensal de nasofaringe, y ocasionalmente se vuelven patógenos causando enfermedades localizadas. las infecciones invasivas por HiNT tienden a afectar a poblaciones susceptibles más que a individuos sanos, como personas con función inmunitaria deteriorada (bebés prematuros, adultos mayores, pacientes con cáncer o bajo terapia inmunosupresora) y con enfermedades cardiovasculares crónicas, insuficiencias respiratorias y enfermedades metabólicas. En los niños, los HiNT son la causa más común de otitis media y, en adultos, la mayoría de las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) se exacerban por la participación de los HiNT. Además, los HiNT pueden causar sinusitis, epiglotitis, bronquitis, neumonía y, con menos frecuencia, bacteriemia y meningitis.[5]

HiNT es una causa de neumonía en niños, si bien es una causa reconocida de neumonía bacteriémica y no bacteriémica en adultos, los datos sobre la importancia

relativa de la neumonía por HiNT en la infancia es limitada y, hasta cierto punto, conflictiva. Esto se debe, en parte, a la dificultad para obtener muestras para determinar la causa de infecciones del tracto respiratorio inferior no bacteriémicas que no han sido contaminado con comensales del tracto respiratorio superior.[6]

CASO CLINICO

Lactante femenina de 1 año 10 meses de edad originaria y residente de Malpaso Mezcalapa, Chiapas, que acude a Hospital remitida de su Centro de Salud, diagnosticada con derrame pleural derecho e Infección Respiratoria Aguda Grave (Figura 1).

Figura 1. Radiografía de Tórax se observa derrame pleural en pulmón derecho.

Inicio padecimiento 11 días previos con tos no productiva, fiebre no cuantificada, tos y anorexia, con tratamiento no especificado, posteriormente reinicia cuadro clínico con tos exacerbada, expectoración amarillenta, astenia, adinamia y dificultad respiratoria desde 6 días anteriores a la consulta en el Centro.

ANTECEDENTES PERSONALES

Embarazo y parto normoevolutivo a término, producto de gesta 2, obtenido por vía vaginal, atendido por partera en Mezcalapa, cumplido 40 SDG. Producto recién nacido de 3.5 kg. Lactancia materna únicamente por 15 días, posteriormente alimentada con formula láctea. Correcta introducción de la alimentación complementaria. No enfermedades previas de interés. Vacunación contra BCG, VHB aplicación de las 3 dosis, Pentavalente acelular: se aplicaron las 3 primeras dosis, sin aplicación del refuerzo a los 18 meses, Rotavirus se aplicaron las 3 dosis, Neumococo conjugada se aplicaron las 3 dosis, Influenza se aplicaron todas las dosis, Triple viral se aplicó dosis al año.

EXPLORACIÓN FÍSICA

Peso: 11 kg, Talla: 86 cm, FC 143/min, FR 32/min Tax 38º, Sat O2 92% con Mascarilla Bolsa Reservorio 10 L/min.

Hiporeactiva, asténica, disneica, con palidez de tegumentos, afectación del estado general. Tiraje intercostal y aleteo nasal. Campos pulmonares hipoventilado del lado derecho. Resto de la exploración física sin hallazgos.

EXPLORACIONES COMPLEMENTARIAS EN URGENCIAS

- **Gasometría venosa: pH 7.22, pCO2 53,5, HCO3 20,9, EB -5.6**

Parámetro de laboratorio	Ingreso	Egreso
Eritrocitos	3.24 10 6/µL	4.02
Hb	9.4 g/dL	11.7
Hto	27.8 %	34.8
Volumen Globular Medio (MCV)	85.7 fL	86.7
Concentración Media de Hb (MCH)	29.0 pg	29.0
Concentración corporal media de Hb (MCHC)	33.9 g/dL	33.5
Leucocitos	11890 /µL	15200
Neutrófilos	72.5 %	44
Linfocitos	14.9 %	43.8
Monocitos	12.3 %	11.1
Plaquetas	875 x 10 ^ 3/ µL	483
Glucosa	99 mg/dl	75
Urea	28.85 mg/dl	9.39
Creatinina	0.29 mg/dl	0.09
Proteína C Reactiva	10.1 mg/dl	0.5
Proteínas totales	6.33 g/dL	5.84
Albúmina	2.64 g/dL	3.07

- **Rx tórax: Imagen con derrame pleural derecho de aproximadamente 50%**

Durante su estancia en Urgencias, tras canalizar acceso venoso y administración de oxígeno, se decide punción diagnóstica con drenaje purulento y colocación de Sello pleural en lado derecho, al momento de su colocación se obtienen 40 ml y por sello 50 ml.

El mismo día de su ingreso es notificado el caso al servicio de epidemiologia, el cual da las recomendaciones de No tomar un Exudado Faríngeo por el tiempo de evolución del cuadro clínico así mismo sugirió manejo preventivo de la Infección Respiratoria Aguda.

EVOLUCIÓN

De acuerdo a los resultados observados en la Citometría Hemática de ingreso, leucocitosis a expensas de neutrófilos, se decide iniciar con doble antibioticoterapia a base de Cefotaxima a dosis de 200 mg/kg/día y Clindamicina a dosis de 40 mg/kg/día.

En segundo día de hospitalización el resultado preliminar del cultivo del líquido pleural reporta crecimiento de Bacilos Gram negativos, el Servicio de Infectología Pediátrica modifica el tratamiento antimicrobiano al siguiente esquema: Cefotaxima 50 mg/kg/dosis cada 6 horas y Vancomicina 10 mg/kg/dosis cada 6 horas.

El citoquímico del líquido pleural reportó el color amarillo, de aspecto turbio, purulento, con una densidad de 1.020, sedimento abundante, pH de 7.0; el examen químico reportó la glucosa de 4.72 mg/dl, lactato de 20.4 mmol/L, proteínas de 5030 mg/dl; el examen citológico reportó 10 cel/mm^3 de eritrocitos, leucocitos de 30 cel/mm^3 y polimorfonucleares de 90% y mononucleares 10%; en la tinción de Gram no se observaron estructuras bacterianas ni bacilos ácido alcohol resistentes.

En su tercer día aun con compromiso respiratorio, se progresa de Mascarilla Bolsa Reservorios a dispositivo de Puntas nasales a 3 lpm, sin datos de dificultad respiratoria aun con sonda pleural con drenaje purulento, agregándole apoyo inotrópico con Dobutamina a 10 mcg/kg/min y Norepinefrina a 0.2 mcg/kg/min, con datos de Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica, por la necesidad de uso de aminas. Se administro un paquete globular por la Anemia Normocítica Normocrómica presentada al ingreso.

El resultado del cultivo de líquido pleural se reportó 6 días posteriores a la toma de muestra identificando abundantes colonias de *Haemophilus influenzae* No Tipificable, se mantuvo la misma medicación antibiótica.

Ese mismo día la paciente presento datos de dificultad respiratoria, se tomó control radiográfico observándose neumotórax (Figura 2), se recolocó el sello pleural con resultado favorable al tratamiento.

Figura 2. Radiografía de Tórax observándose neumotórax en pulmón derecho y sonda endopleural.

En su quinceavo día de hospitalización la paciente se encontraba saturando 98% al aire ambiente, sin manejo con antibióticos. En su diecisieteavo día de hospitalización sin apoyo ventilatorio, ni aminergico, pero aun con datos de infección de pulmón derecho y con leucocitosis de 15200, Neutrofilos 44%, Linfocitos 43.8%, Monocitos 11.1%, Basofilos 0.4%, Eosinófilos 0.7%, Poteína C Reactiva 3.8, Hemoglobina 11.7 g/dL, Hematocrito 34.8% y Plaquetas 483000; Se cambio esquema antibiótico por Cefepime a dosis de 150 mg/kg/día.

La evolución fue satisfactoria con egreso de la paciente posterior a 24 días de hospitalización, con terapia pulmonar.

DISCUSIÓN

Reportamos el caso de una lactante previamente vacunada contra Hib que desarrolló una forma grave de neumonía causada por HiNT. Los niños sanos son portadores de HiNT en faringe, estas cepas pueden llegar a ser invasoras y producir infecciones graves. En los países desarrollados, HiNT es frecuentemente aislado de adultos con exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, bronquiectasias y fibrosis quística. Por el contrario, estas cepas son una causa importante de neumonía en niños que viven en países en desarrollo. [7]

Antes de la introducción de las vacunas Hib, las cepas HiNT eran una causa menor de enfermedad invasiva, que afectaba especialmente a los adultos. Hoy en día, el serotipo invasivo predominante se ha cambiado de Hib a serotipos no b como por ejemplo serotipo a o incluso HiNT [12, 14] . La enfermedad invasiva por HiNT ocurre en todos los grupos de edad y representan el 77% de todos los casos invasivos de *H. influenzae* notificados, en Europa. Considerando que las presentaciones clínicas de HiNT para la mayoría de los

casos son septicemia (81.1%), meningitis (61,7%) y neumonía septicémica (82,2%). [8]

La transmisión se produce a través de secreciones respiratorias por inhalación de gotas y/o contacto directo, la transmisión neonatal ocurre por aspiración de líquido amniótico o contacto con secreciones genitales. Desde la introducción de la vacuna Hib en 1985, la incidencia entre los niños más pequeños ha disminuido en aproximadamente un 99%. La enfermedad por Hib ahora ocurre principalmente en niños no vacunados, incluidas las comunidades cerradas, aquellos con virus de inmunodeficiencia humana (VIH), con patologías relacionadas a la función esplénica, algunas inmunodeficiencias y deterioro de la función inmune secundaria a malignidad y / o quimioterapia. Hib sigue siendo una causa importante tanto de meningitis y neumonía en países pobres y en desarrollo donde la vacunación no está disponible. HiNT es ahora la principal causa de enfermedad invasiva en todos los grupos de edad y causa el 62.5% de los casos de enfermedades invasivas en niños más pequeños de 5 años.

Los datos emergentes apuntan a la creciente importancia de HiNT como patógeno en infecciones del tracto respiratorio superior e inferior y en enfermedad invasiva, la evidencia epidemiológica muestra un aumento en la propagación de resistencia a los antibióticos β-lactámicos no dependiente de β-lactamasa.[9]

Los datos sobre la importancia relativa de HiNT en la neumonía infantil son limitados, debiéndose en parte a la dificultad de obtención de muestras para determinar la causa. En niños pequeños puede ser difícil distinguir la neumonía de la bronquiolitis. Es necesario considerar a esta posible etiología al momento de iniciar una antibioterapia empírica, así como procurar determinar el agente etiológico de la enfermedad.

Como observamos en el caso clínico, la paciente únicamente fue alimentada con leche materna durante los primeros 15 días de vida, es indispensable una adecuada nutrición en los niños ya que son más susceptibles a todo tipo de infecciones, particularmente se ha descrito mayor morbimortalidad en los pacientes desnutridos que cursan infecciones respiratorias, debido principalmente al deterioro de los mecanismos defensivos pulmonares y la disminución de la masa magra. Ambos factores afectan la función pulmonar, favorecen un patrón restrictivo y aumentan el trabajo respiratorio. La lactancia materna puede conferir protección contra algunas infecciones adquiridas en la comunidad desde el primer mes de vida, además existe un mayor riesgo de infección del tracto respiratorio, incluida neumonía recurrente en niños que fueron amamantados exclusivamente durante 4 frente a 6 meses. Estos hallazgos respaldan las recomendaciones actuales de que los bebés reciban solo leche materna durante los primeros 6 meses de vida, aunado a los correctos esquemas de vacunación. [10, 11, 13]

CONCLUSIÓN

Aunque no se describan incremento de este tipo de casos en la región, los médicos

deben estar atentos a los datos clínicos respiratorios y tomar en cuenta la presencia de esta bacteria. Creemos que la vigilancia de síntomas respiratorios en todos los niños debe ser llevada a cabo de forma responsable para evitar decesos o complicaciones causadas por *Haemophilus influenzae* no tipificable, el cultivo bacteriano y antibiograma son fundamentales para la determinación y tratamiento exitoso de estos patógenos.

REFERENCIAS

1. Adaji, E. E., Ekezie, W., Clifford, M., & Phalkey, R. (2019). Understanding the effect of indoor air pollution on pneumonia in children under 5 in low- and middle-income countries: a systematic review of evidence. Environmental science and pollution research international, 26(4), 3208–3225. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3769-1

2. Picot, V. S., Bénet, T., Messaoudi, M., Telles, J. N., Chou, M., Eap, T., Wang, J., Shen, K., Pape, J. W., Rouzier, V., Awasthi, S., Pandey, N., Bavdekar, A., Sanghvi, S., Robinson, A., Contamin, B., Hoffmann, J., Sylla, M., Diallo, S., Nymadawa, P., … pneumonia GABRIEL network (2014). Multicenter case-control study protocol of pneumonia etiology in children: Global Approach to Biological Research, Infectious diseases and Epidemics in Low-income countries (GABRIEL network). *BMC infectious diseases*, *14*, 635. https://doi.org/10.1186/s12879-014-0635-8.

3. Marangu, D., & Zar, H. J. (2019). Childhood pneumonia in low-and-middle-income countries: An update. Paediatric respiratory reviews, 32, 3–9. https://doi.org/10.1016/j.prrv.2019.06.001

4. Wegele, C., Stump-Guthier, C., Moroniak, S., Weiss, C., Rohde, M., Ishikawa, H., Schroten, H., Schwerk, C., Karremann, M., & Borkowski, J. (2020). Non-Typeable *Haemophilus influenzae* Invade Choroid Plexus Epithelial Cells in a Polar Fashion. *International journal of molecular sciences*, *21*(16), 5739. https://doi.org/10.3390/ijms21165739

5. Mary P E Slack, The evidence for non-typeable *Haemophilus influenzae* as a causative agent of childhood pneumonia. Pneumonia (Nathan). 2017 Jun 25;9:9.

6. Slack MPE. The evidence for non-typeable Haemophilus influenzae as a causative agent of childhood pneumonia. Pneumonia [Internet]. 25 de junio de 2017 [citado 27 de marzo de 2020];9. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5483294/

g7. Wang S-R, Tseng M-H, Lin W-J, Teng C-S, Wang C-C. Fatal non-typeable Haemophilus influenzae sepsis complicated with acute respiratory distress syndrome: case report and literature review. Scand J Infect Dis. 2005;37(11-12):921-5.

8. Cerquetti M, Giufrè M. Why we need a vaccine for non-typeable Haemophilus influenzae. Hum Vaccines Immunother. 12 de mayo de 2016;12(9):2357-61.

9. Eldere JV, Slack MPE, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable Haemophilus influenzae, an under-recognised pathogen. Lancet Infect Dis. 1 de diciembre de 2014;14(12):1281-92.

10. Chantry, C. J., Howard, C. R., & Auinger, P. (2006). Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. *Pediatrics*, *117*(2), 425–432.

11. Vega-Briceño, L. E., Perret, C., Holmgren, N., & Sánchez, I. (2005). Neumonía grave causada por Haemophilus influenzae no tipificable en un lactante: reporte de un caso [Non-typable Haemophilus influenzae severe pneumonia in an infant: case report]. *Revista chilena de infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, *22*(1), 89–92. https://doi.org/10.4067/s0716-10182005000100011

12. Fernández Rodríguez, B., García Pimentel, B., González-Granado, L. I., & Negreira Cepeda, S. (2010). Empiema por Haemophilusinfluenzae no tipable en la era de la vacunación frente al serotipo B [Non-typeable Haemophilus influenzae empyema in the serotype b vaccine era]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*, *72*(5), 360–362. https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.02.002

13. DeAntonio, R., Amador, S., Bunge, E. M., Eeuwijk, J., Prado-Cohrs, D., Nieto Guevara, J., Rubio, M., & Ortega-Barria, E. (2019). Vaccination herd effect experience in Latin America: a systematic literature review. *Human vaccines & immunotherapeutics*, *15*(1), 49–71. https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1514225

14. Navarro-Alonso, J. A., Taboada-Rodríguez, J. A., Limia-Sánchez, A., & Grupo de Trabajo de Revisión del Calendario de Vacunación, 2015 (2016). Nuevo calendario de vacunación para España, 2016 (Parte 2) [Toward a New Immunization Schedule in Spain, 2016 (Part 2)]. *Revista espanola de salud publica*, *90*, E3.

15. Goicoechea Sáez, M., Fullana Montoro, A. M., Momparler Carrasco, P., Redondo Gallego, M. J., Brines Solanes, J., & Bueno Cañigral, F. J. (2002). Enfermedad invasora for Haemophilus Influenzae antes y después de la campaña de vacunación en la población infantil de la Comunidad Valenciana (1996-2000) [Haemophilus Influenzae infection before and after the immunization campaign among children in the Valencia community (1996-2000)]. *Revista espanola de salud publica*, *76*(3), 197–206.

CAPÍTULO 7

EFFECTS OF HIGH ROSUVASTATIN DOSES ON HEPATOCYTE MITOCHONDRIA OF HYPERCHOLESTEROLEMIC MICE

Data de aceite: 01/02/2022

Juan C. Díaz-Zagoya

Alejandro Marín-Medina

Alma M. Zetina-Esquivel

Jorge L. Blé-Castillo

Andrés E. Castell-Rodríguez

Isela E. Juárez-Rojop

Rodrigo Miranda-Zamora

ABSTRACT: Statins are the cornerstone of therapy for individuals with hyperlipidemia. The aim of this study was to analyze the undesirable effects of mild, moderate and high doses of rosuvastatin in CD-1 male mice who received a cholesterol-rich diet, focusing on the morphological and functional changes on hepatocyte mitochondria. In a mouse model we studied the combined administration of a cholesterolrich diet along with mild and moderate doses of rosuvastatin (1, 2.5 or 5 mg/kg/day) during several days. After the animals were sacrificed, liver mitochondria were isolated for microscopic studies and to analyze the respiratory function. The respiratory control (state-3/state-4) was evaluated in mice who received high doses of rosuvastatin. Rosuvastatin doses higher than 20 mg/kg/day induced premature death in mice with a hypercholesterolemic diet, but not in mice with a cholesterolfree diet. Doses from 2.5 to 5 mg/kg/day also induced morphological and functional alterations in mitochondria but these hypercholesterolemic animals survived longer. Giving 1 mg/kg/day, which is close to the maximal therapeutic dose for humans, did not affect mitochondrial architecture or respiratory function after two months of treatment. We analyzed the effect of rosuvastatin on hepatic tissue because it is where statins are mainly accumulated and it is the main site of endogenous cholesterol synthesis. Our results contribute to understand the side effects of rosuvastatin in hypercholesterolemic mice, effects that could also affect humans who are intolerant to statins

RESUMO: As estatinas são a pedra angular da terapia para indivíduos com hiperlipidemia. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos indesejáveis de doses leves, moderadas e altas de rosuvastatina em camundongos CD-1 machos que receberam dieta rica em colesterol, com foco nas alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias dos hepatócitos. Em um modelo de camundongo, estudamos a administração combinada de uma dieta rica em colesterol juntamente com doses leves e moderadas de rosuvastatina (1, 2,5 ou 5 mg/kg/dia) durante vários dias. Após o sacrifício dos animais, as mitocôndrias hepáticas foram isoladas para estudos microscópicos e para análise da função respiratória. O controle respiratório (estado-3/estado-4) foi avaliado em camundongos que receberam altas doses de rosuvastatina. Doses de rosuvastatina superiores a 20 mg/kg/dia induziram morte prematura em camundongos com dieta hipercolesterolêmica, mas não em camundongos com dieta livre de colesterol.

Doses de 2,5 a 5 mg/kg/dia também induziram alterações morfológicas e funcionais nas mitocôndrias, mas esses animais hipercolesterolêmicos sobreviveram por mais tempo. A administração de 1 mg/kg/dia, que é próxima da dose terapêutica máxima para humanos, não afetou a arquitetura mitocondrial ou a função respiratória após dois meses de tratamento. Analisamos o efeito da rosuvastatina no tecido hepático, pois é onde as estatinas são principalmente acumuladas e é o principal local de síntese endógena de colesterol. Nossos resultados contribuem para entender os efeitos colaterais da rosuvastatina em camundongos hipercolesterolêmicos, efeitos que também podem afetar humanos intolerantes às estatinas.

Statins are the cornerstone of therapy for individuals with hyperlipidemia. The aim of this study was to analyze the undesirable effects of mild, moderate and high doses of rosuvastatin in CD-1 male mice who received a cholesterol-rich diet, focusing on the morphological and functional changes on hepatocyte mitochondria. In a mouse model we studied the combined administration of a cholesterolrich diet along with mild and moderate doses of rosuvastatin (1, 2.5 or 5 mg/kg/day) during several days. After the animals were sacrificed, liver mitochondria were isolated for microscopic studies and to analyze the respiratory function. The respiratory control (state-3/state-4) was evaluated in mice who received high doses of rosuvastatin. Rosuvastatin doses higher than 20 mg/kg/day induced premature death in mice with a hypercholesterolemic diet, but not in mice with a cholesterolfree diet. Doses from 2.5 to 5 mg/kg/day also induced morphological and functional alterations in mitochondria but these hypercholesterolemic animals survived longer. Giving 1 mg/kg/day, which is close to the maximal therapeutic dose for humans, did not affect mitochondrial architecture or respiratory function after two months of treatment. We analyzed the effect of rosuvastatin on hepatic tissue because it is where statins are mainly accumulated and it is the main site of endogenous cholesterol synthesis. Our results contribute to understand the side effects of rosuvastatin in hypercholesterolemic mice, effects that could also affect humans who are intolerant to statins.

Statins are the drugs of choice as first and second prevention of atherosclerosis cardiovascular diseases (ASCVD). The introduction of statins to clinical medicine in 1 987[1] was followed by an extensive therapeutic use for individuals with high serum cholesterol levels in order to control β-containing lipoproteins recognized as ASCVD risk factors[2,3]. Particularly, rosuvastatin is highly used in the clinical practice; 40 mg/day is the highest dose for humans, which means that for an individual weighting 60 kg, the dose is 0.66 mg/kg/day.

Some medical societies have recommended an aggressive use of statins to treat individuals with high ASCVD risk[4–7]. All statins available in the market have the same effect on cholesterol biosynthesis, inhibiting in a competitive way the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase[8,9] that catalyzes the formation of mevalonate. This action predominantly affects liver cholesterol synthesis, which is responsible for 80% of its endogenous production in h umans[10]. Statins also reduce oxidative stress by modulating the redox systems. This is probably a mechanism by which they exert beneficial effects

on the cardiovascular system; however, the oxidative stress may also be responsible for statin-induced adverse effects, such as the actions on glucose homeostasis or producing nephrotoxicity[11].

As any pharmaceutical compound, statins are not exempted of undesirable side effects, especially after high therapeutic doses during long periods of time, as well as when they are used in individuals with statins intolerance, with a prevalence of 7–29%[12,13].

There are two types of statins, the natural compounds that were isolated from fungi cultures and the synthetic compounds produced in the laboratory. Synthetic statins are more active and potentially produce more undesirable effects[14]. The solubility of statins also influences their potential accumulation in tissues, as it happens with lipid-soluble compounds[15].

Animal models can be used to evaluate and compare the side effects of statins[16]. One of the first adverse effects reported is that of lovastatin in rabbits[17], which was aggravated when a cholesterol-rich diet was added. Some studies have used rodent models to analyze the statins side effects in hypercholesterolemic animals[18,19]. Our study provides data of mice who received a cholesterol-rich diet along with mild, moderate and high doses of rosuvastatin. We particularly looked for adverse effects on liver mitochondria of mice who received a cholesterol-rich-diet in comparison with mice who received a cholesterol-free diet and the same doses of rosuvastatin.

MATERIAL AND METHODS

According to their solubility, the statins employed in patients are divided in two groups, the lipophilic constituted by fluvastatin, lovastatin, simvastatin and pitavastatin, and the hydrophilic integrated by rosuvastatin and pravastatin. It was chosen for this study rosuvastatin that is widely used by clinicians[20]. CD-1 male mice of 30 g body weight were maintained in light–dark cycles of 12 h. They received a laboratory chow diet (CD) containing 18% protein, 5% fat and 5% fiber. The food was powdered and rosuvastatin was added; then, food and statin were administered orally. The hypercholesterolemic diet (HD) contained 2% cholesterol and 0.6% sodium deoxycholate. Rosuvastatin tablets of 20 mg were obtained from Medimart, Slovenia. All other compounds were purchased from Merck-Sigma Mexico.

It was also included CD and HD animals that did not receive rosuvastatin (n = 6 per group). The experimental procedures followed the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines established by the Research Committee for the Care and the Use of Laboratory Animals of the “Universidad Nacional Autónoma de México”.

EXPERIMENTAL DESIGN

A. Mice who received a continuous treatment with rosuvastatin (Ro) for 30 days in order to evaluate their survival rate:

CD + Ro (rosuvastatin 0, 20, 50, 100, 200, 400 mg/kg/day).

HD + Ro (rosuvastatin 0, 20, 50, 100, 200, 400 mg/kg/day).

B. Mice who received a continuous treatment with moderate-high statin doses to evaluate hepatocyte mitochondrial respiration. The microscopic observations were performed in representative samples of each group after different treatment lengths for 5 days:

CD + Ro (rosuvastatin 0, 20 mg/kg/day).

HD + Ro (rosuvastatin 0, 20 mg/kg/day).

C. Mice who received a continuous treatment with mild doses of statin to evaluate hepatocytes mitochondrial respiration and to perform microscopic observations in representative samples of each group after different treatment lengths for 60 days:

HD + Ro (rosuvastatin 0, 5 mg/kg/day).

HD + Ro (rosuvastatin 0, 2.5 mg/kg/day). HD

+ Ro (rosuvastatin 0, 1 mg/kg/day).

ANIMAL SACRIFICE

After the treatment indicated in the experimental design, all animals were sacrificed employing a guillotine[21]. Blood and other tissues were immediately obtained for biochemical analysis or microscopic studies.

MITOCHONDRIA ISOLATION AND INCUBATION

The liver was homogenized in 250 mM sucrose, 0.5 mM HEPES, 0.5 mM EGTA (SHE) at pH 7.2 and using a Thomas pestle tissue grinder (piston-type Teflon pestle). The liver was homogenized with a soft manual procedure in order to generate the minor damage to mitochondria; then, mitochondria were isolated using a refrigerated centrifuge MPW-353R Med Instruments, Warsaw, following the method described by Frezza et al.[22]. The mitochondria obtained by centrifugation were incubated for 10 min with 0.5% albumin to eliminate fatty acids; then, they were re-suspended in SHE solution. The protein content in mitochondria was evaluated by the Bradford method[23]. The incubation media contained: KCl 240 mM, HEPES 60 mM, H_3PO_4 4 mM, EGTA 4 mM, Succinate 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, mitochondrial protein 4 mg, at pH 7.2, final volume 3.2 ml. An YSI oxygen meter 5300 model was used to measure the oxygen consumption. The mitochondrial respiration was stimulated by adding 10 μL of 200 mM ADP[24]. And the respiratory control was evaluated.

BIOCHEMICAL PARAMETERS

Serum determinations included total cholesterol, triacylglycerols, HDL-C (high density lipoprotein cholesterol), glucose, urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase). We used a semi-automatic equipment of clinical chemistry from Random Access Diagnostics. Besides, the 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA/ mevalonate ratio was evaluated, this index determines the activity of the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A r eductase[25].

MICROSCOPY STUDIES

Livers were studied both by light and electronic microscopy. The tissue slices were dyed with hematoxylin–eosin and were observed under a Nikol Eclipse 180 microscope. For electronic microscopy the mitochondrial pellet and liver tissue were fixed with 3% glutaraldehyde in cacodylate buffer. The samples were processed at the microscopy unit of the "Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México", using a Jeol transmission electron microscope model JEM-1010.

Biochemical parameter	CD	CD + Ro1	HD	HD + Ro1	HD + Ro3	HD + Ro5
Triacylglycerols (mg/dL)	103 ± 1.41	180.5 ± 0.70[a]	97 ± 2.82	131 ± 0.71[b]	47 ± 2.82[b]	53 ± 0.80[b]
Cholesterol (mg/dL)	116.0 ± 1.41	116.0 ± 2.83	202 ± 5.65[a]	165.5 ± 2.12	761.5 ± 0.70[b]	813 ± 1.06[b]
HDL-C (mg/dL)	58.80 ± 1.27	58.35 ± 0.64	59.2 ± 0.63	57.35 ± 1..20	16 ± 1.06[b]	14 ± 0.14[b]
ALT (IU/L)	102.4 ± 5.44	95.58 ± 3.82	113.4 ± 2.24	95.58 ± 3.82	1.67 ± 0.29[b]	1.93 ± 0.52[b]
AsT (IU/L	261.8 ± 1.44	265.8 ± 2.54	275.1 ± 4.34	263.7 ± 1.82	2.33 ± 0.64[b]	2.17 ± 0.60[b]

Table 1. Effect of Rosuvastatin (20 mg/kg/day) in cholesterol, triacylglycerols, HDL-C, and transaminases in serum of mice. Triacylglycerols, cholesterol, HDH-C serum level, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT), Ro (Rosuvastatin). Values represent the mean ± SEM of eight animals. Statistical analysis was done by One ANOVA, followed by the Student-Newman–Keuls test. Key of significance: acompared with CD and bwith HD ($p < 0.05$).

Group	State 4	State 3	Respiratory control
CD	0.15 ± 0.02	0.53 ± 0.08	3.45 ± 0.07
HD	0.23 ± 0.02	0.72 ± 0.10	3.05 ± 0.07
CD + Ro/5 day	0.19 ± 0.00	0.62 ± 0.07	3.10 ± 0.28
HD + Ro/1 day	0.25 ± 0.03	0.71 ± 0.01	2.80 ± 0.28
HD + Ro/3 days	0.10 ± 0.01	0.30 ± 0.10	2.90 ± 0.56
HD + Ro/5 days	0.09 ± 0.13	0.09 ± 0.13[a]	0.95 ± 0.63[a]

Table 2. Respiratory control in hepatocyte mitochondria of mice with cholesterol-rich diet treated with rosuvastatin 20 mg/kg/day. *CD* control diet; *HD* hypercholesterolemic diet; *Ro* rosuvastatin 20 mg/kg/ day; Key of significance: [a]compared with HD ($p < 0.05$).

STATISTICAL ANALYSIS

The mice survival was expressed in percentages. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Student–Newman–Keuls test and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. For morphologic analysis we used representative samples from each of the animal groups.

RESULTS

Biochemical parameters

Serum triacylglycerols decreased after receiving HD + Ro 20 mg/kg/day on day 3 (47 ± 2.82 mg/dL) and day 5 (53 ± 0.80 mg/dL) versus HD without Ro (97 ± 2.82 mg/dL). Conversely, serum cholesterol levels increased significantly on days 3 and 5 (761.5 ± 0.7 mg/dL and 813 ± 1.06 mg/dL, respectively) versus HD without Ro (202 ± 5.65 mg/dL). HDL-C decreased after receiving HD + Ro 20 mg/kg/day on days 3 and 5 (16 ± 1.06 mg/dL and 14 ± 0.14 mg/dL, respectively) compared with HD without Ro (59.2 ± 0.63 mg/dL) (Table 1). An unexpected result was the disturbing decrease in ALT and AST serum activity that was almost undetected on days 3 and 5 after treatment (1.67 ± 0.29 IU/L; 1.93 ± 0.52 IU/L, and 2.33 ± 0.64 IU/L, 2.17 ± 0.60 IU/L; respectively) (Table 1). Regarding the respiratory function, it decreased after 3 and 5 days of receiving HD + Ro 2.90 ± 0.56 and 0.95 ± 0.63) in comparison with HD without Ro (3.05 ± 0.07) (Table 2). The 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA/mevalonate ratio, which was high after 3 days of HD + Ro treatment, and even higher after 5 days of treatment (3.93 ± 1.30), versus the HD without Ro group (2.53 ± 0.31) ($p < 0.05$) (Fig. 1). These data reveal that rosuvastatin decreased the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase.

Effect of high doses of rosuvastatin on the survival of mice with a cholesterol-rich diet

Table 3 shows the mice survival rate when using different doses of rosuvastatin. The combined administration of Ro and a cholesterol-rich diet produced a premature death with doses 20 mg/kg/day or higher of rosuvastatin. However, there was no-mortality in animals without a cholesterol-rich diet that received the same statin doses. In this context, studies performed by Diaz-Zagoya et al.,[18,19] showed that high doses of statins administered in a period of 30–60 days in a mouse model without a high-cholesterol diet had a survival rate of 100%.

Effect of moderate doses of rosuvastatin on mice with a cholesterol-rich diet

A 20 mg/kg/day dose of Ro was tested in mice receiving CD or HD. Animals in the HD

+ Ro group were sacrificed on days 1, 3 and 5 of treatment. A daily analysis was performed in order to observe any morphologic changes in hepatocytes and the respiratory function of mitochondria. The body weigh was registered, as well as the liver weigh in relation to the body weight. Macroscopically, livers of the animal group treated with statins were friable with appearance of steatosis. Table 4 shows that the liver weight of animals who received HD + Ro 20 mg/kg/day increased significantly after 3 and 5 days of treatment. In this regard, previous studies performed by Diaz-Zagoya et al.,[18,19] showed that no significant changes were observed on day 1 and 3. However, an increase in the weight of the mice liver in relation to body weight was observed in CD + Ro 5 mg/kg/day, this difference was not significant with respect to CD. An increase in the weight of mice liver in relation to body weight was observed in the CD + Ro group, but it was not significant with respect to the CD and HD group.

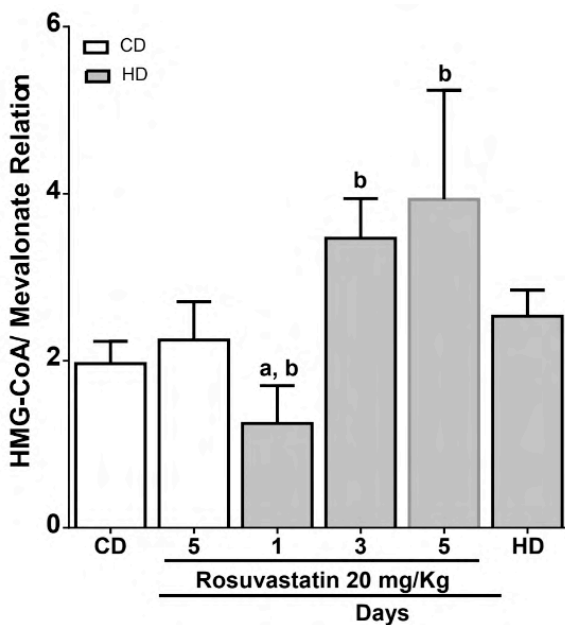



Figure 1. Absorbance of 3-hydroxymethylglutaryl-CoA/mevalonate ratio in the liver homogenate. CD control diet, HD hypercholesterolemic diet. Key of significance: [a]compared with CD and [b]with HD ($p < 0.05$).

Ro mg/ day	Day							
	0	**4**	**5**	**6**	**7**	**17**	**18**	**30**
0	100	100	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	83	83	66.4	50
50	100	100	50	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6
100	100	100	66.4	16.6	16.6	16.6	16.6	16.6
200	100	100	0	0	0	0	0	0
400	100	100	16.6	0	0	0	0	0

Table 3. Mice survival after high doses of rosuvastatin plus a cholesterol-rich diet, after 30 Days of Treatment. *Ro* rosuvastatin, mg/kg/day.

MICROSCOPY OBSERVATIONS

Liver tissue was stained with hematoxylin/eosin and evaluated after 1, 3 and 5 days of treatment with HD + Ro 20 mg/kg/day. Liver tissue of CD + Ro 20 mg/kg/day (Fig. 2B) or HD (Fig. 2C) showed no alteration compared to liver tissue of CD without Ro (Fig. 2A). Livers of mice who received HD + Ro 20 mg/kg/day, after 1 to 5 days of treatment, showed early steatosis with abundant lipid drops and severe changes such as ballooning degeneration, Mallory Denk bodies and hepatocytes with loss of nuclei. No necrosis was observed (Fig. 2D–F).

EFFECT OF MILD DOSES OF ROSUVASTATIN ALONG WITH A CHOLESTEROL-RICH DIET

Rosuvastatin doses of 0, 1, 2.5 and 5 mg/kg/day were used during different periods of time. Mice were sacrificed every day and the morphological and physiological evaluations were performed. Animals that received HD + Ro 5 mg/kg/day did not show important differences in their body weight in comparison with other groups; however, their liver weight increased significantly from day 5 on, a fact that was highly apparent when we compared the percentage of liver weight relative to body weight (Table 4). A similar result was obtained with Ro 2.5 mg/kg/day, after 15 days of treatment (Table 4), but not when Ro 1.0 mg/kg/day was administered for 59 days. Treatments with HD + Ro 2.5 and 5 mg/kg/day produced an impaired respiratory function, lower respiratory control and higher oxygen consumption. On day 59 of treatment, a decrease in respiratory control was observed in the Cd + Ro group 1 mg/ kg/day (2.96) compared to day 0 in the CD group (3.44) and in the HD + Ro group at 1 mg/kg/day (3.56) on day 59. On the other hand, animals treated with HD + Ro 1.0 mg/kg/ day, did not show alterations of the mitochondrial function even after 59 days of treatment (Table 5). It was observed that the HD + Ro 2.5 mg/kg/day group decreased respiratory control (1.80) with respect to the HD group (3.22), this result is similar to the group that received a dose of 5 mg/kg/day (1.79); at the same period of treatment on 5 days (Table 5).

The HD + Ro 5 mg/kg/day treatment (Fig. 3A) was observed to be harmful to mitochondria, showing loss of architecture pattern, some had a donut-like shape and matrixes with empty spaces. The HD + Ro 2.5 mg/kg/day treatment (Fig. 3B) displayed copious mitochondrial damage and disorganized organelle structure. Mitochondria obtained after 59 days of HD + Ro 1 mg/kg/day treatment (Fig. 3C) showed a general conserved structure with few organelles having a horseshoe aspect. Mitochondria in Fig. 3D–F are the corresponding controls.

Length of treatment (day)	Liver weight (g; m ± SD)	% of liver weight relative to body weight
20 mg/kg/day Ro		
CD	1.71 ± 0.26	9.11
HD	1.85 ± 0.21	5.89
CD + Ro 1	1.86 ± 0.15	7.60
CD + Ro 5	2.28 ± 0.15	8.28
HD + Ro 1	1.65 ± 0.16	7.54
HD + Ro 3 d	2.59 ± 0.79[a]	11.20
HD + Ro 5	3.30 ± 0.62[a]	14.10
2.5 mg/kg/day Ro		
HD + Ro 1	1.20 ± 0.27	5.0
HD + Ro 3	1.41 ± 0.39	6.52
HD + Ro 5	1.50 ± 0.31	7–06
HD + Ro 7	2.04 ± 0.38	9.06
HD + Ro 9	2.73 ± 0.71[a]	10.95
HD + Ro 11	2.63 ± 0.79[a]	11.25
HD + Ro 13	2.48 ± 0.25	10.59
HD + Ro 15	2.40 ± 0.35	11.23

Table 4. Liver weight and its relation to body weight in hypercholesterolemic mice treated with 20 and 2.5 mg/kg/day of rosuvastatin, after days of treatment. *CD* control diet; *HD* hypercholesterolemic diet; *Ro* rosuvastatin 20 mg/kg/day; Ro rosuvastatin 2.5 mg/kg/day, *M* media, *SD* standard deviation. [a]Key of significance compared with HD ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Rosuvastatin is a powerful synthetic statin that is not exempted of undesirable effects in doses regularly used in humans. If a human of 70 kg body weight, receives a rosuvastatin dose of 40 mg/day, he or she is receiving 0.57 mg/kg/day. We administered different doses to mice, the smallest was equivalent to 1 mg/kg/day; higher doses produced several undesirable effects in our mice model, especially in the liver, the main site of statin accumulation. The 400 mg dose had a 100% mortality after 6 days of treatment, a result that could be explained by the damage, non-compatible with life, produced on mitochondria structure and function; therefore, a moderate-high dose was considered to be 20 mg/kg/day

and the mild to moderate doses between 1 and 5 mg/kg/day.

Although some studies have shown that rosuvastatin significantly reduces serum cholesterol concentrations by using lyophilized t ablets[26], we observed an increase in serum cholesterol on days 3 and 5 (761.5 ± 0.7 mg/dL and 813 ± 1.06 mg/dL, respectively) in the HD + Ro group versus the HD without Ro group (202 ± 5.65 mg/dL). Previous studies have already reported that undesirable effects of statins are aggravated if a diet rich in cholesterol is added[17]. The combination of HD + Ro can modify the dynamics of the cholesterol metabolism genes, since when cholesterol concentrations increase, the catalytic release of SREBP2 proteins is blocked, which are important transcription factors for the expression of many genes such as the hepatic LDL receptor (LDLR)[27]. Therefore, having a HD diet could influence the expression of these genes by decreasing the amount of LDLR in the liver, so the amount of cholesterol that reaches the liver could be reduced and redistributed in plasma and other tissues.

Other studies have reported an increase in serum cholesterol due to the use of rosuvastatin, it has been observed that mice treated with Ro had an increase in total serum cholesterol; and although Ro has been observed to cause an increase in hepatic LDL receptor messenger RNA in humans, the opposite effect has been observed in rats[28]. Therefore, the amount of this protein in the liver decreases and the serum concentration of cholesterol increases. This result supports the increase in serum cholesterol found in our study from the third day of treatment with Ro; therefore, this double effect could explain the increase in cholesterol in mice treated with HD + Ro.

Undesirable side effects have also been reported in human skeletal muscle where myositis and even rhabdomyolysis have been o bserved[29]. Although the use of low-dose statins helps to restore the histological architecture of the liver in individuals with N AFLD[30], it has also been observed that in individuals with complicated sepsis, statins appear to accelerate liver damage. In this sense, we observed that Ro at low doses (1 mg) did not significantly affect respiratory function, even in a prolonged treatment (59 days) compared with doses of 5 and 2.5 mg that significantly affected respiratory function from day 5. A study on mice with dystrophin protein deficiency who received 10 mg/kg of rosuvastatin, showed significantly increased areas of myonecrosis and inflammation, while mice without altered dystrophin who received the same doses showed increased levels of NF-Kβ, TNF-α as well as increased creatine kinase a ctivity[31], which suggests that high doses of rosuvastatin could potentiate the expression of some genes that encode proteins of inflammation pathways. In this sense, some authors presented that Rosuvastatin increases the expression of IL-10, and inhibits the overexpression of NF-κB[32,33]. Besides, there is evidence to suggest that statins inhibit the Myd88 pathway and therefore suppress the NF-κB pathway[34].

Besides the cholesterol-lowering effect of statins, it has been suggested that statins can be used as an associated therapy for COVID-19 due to their anti-inflammatory action that might reduce the risk of cardiovascular complications caused by SARS-CoV-2 virus[35,36].

Therefore, rosuvastatin and other statins are under a close examination.

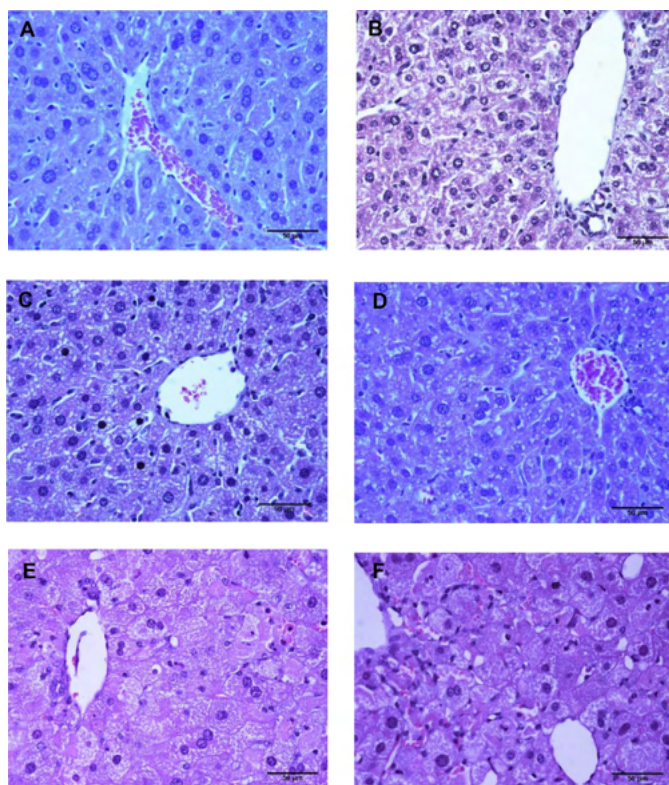



Figure 2. Microscopy images of liver tissue from mice after cholesterol-rich diet and rosuvastatin. Mice liver slices were stained with hematoxylin–eosin. (**A**) CD; (**B**) CD + Ro; (**C**) HD; (**D**) HD + Ro one day; (**E**) HD + Ro 3 days; (**F**) HD + Ro 5 days. CD, control diet; HD, cholesterol-rich diet; Ro, rosuvastatin 20 mg/kg/day. The liver of CD + Ro 20 mg/kg/day obtained after 1, 3 and 5 days of treatment manifest early steatosis and significant changes in the cellular structure. Sinusoidal dilatation (**D–F**), some cells with ballooning degeneration, pyknotic nuclei (**E**,**F**), Mallory Denk bodies (**E**) and hepatocytes with loss of their nuclei (**E**,**F**) are observed.

Rosuvastatin treatment mg/kg/day	Length of treatment (day)	Respiratory control
CD	0	3.44
HD + Ro 5	3	2.20
HD + Ro 5	5	1.79
HD + Ro 2.5	5	1.80
HD + Ro 2.5	9	2.20
HD + Ro 2.5	15	2.40
HD + Ro 1	59	3.56

HD	59	3.22
CD + Ro 1	59	2.96

Table 5. Oxygen consumption by liver mitochondria in hypercholesterolemic mice treated with rosuvastatin 1.0, 2.5 or 5 mg/kg/day, after 60 Days of Treatment. *CD* control diet, *HD* hypercholesterolemic diet, *Ro* rosuvastatin.

In this study, we observed that high doses of rosuvastatin affected liver mitochondria architecture and mitochondrial respiration. We compared the oxygen consumption in states 3 and 4 of respiration; phosphorylation in state 3 was stimulated by adding 200 mM ADP to the incubation medium. The state 3/state 4 ratio decreased when mice received rosuvastatin doses of 2.5 mg/kg/day or higher. Previous studies using high doses of simvastatin in rats and humans have reported a decreased function of complex I in the respiratory chain[37] which considerably decreases the flow of electrons from NADH towards complex III. Therefore, under these conditions the mitochondrial energy load would depend mostly of the electron flow from FADH to complex II, resulting in a lower production of ATP by the ATP synthase. Additionally, the inhibition of the 3-hydroxy-3 methyl glutaryl CoA reductase decreases the formation of coenzyme Q [38], essential for the transport of electrons to complex III and would affect the Q cycle in this complex, which is important for the regeneration of coenzyme Q. All these factors together contribute to a decrease in ATP synthesis.

Animal model studies have explored diseases that affect mitochondrial function altering the transport of metabolites to mitochondria (especially ADP)[39]. We did not explore the intimal mechanism of the respiratory chain alteration, but there is information regarding the changes that other statins induce in muscle mitochondrial function[40–42]. Moreover, a decrease in mitochondrial respiration was observed in rats treated with low doses of Rosuvastatin 1 mg/kg/day (not statistically significant); and a small decrease in respiration of the mitochondrial complex was also reported at the same doses, but without affecting the functioning of this c omplex[37]. We observed that the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA/ mevalonate ratio in liver homogenate was high on day 3 and higher on day 5 of treatment; this result shows the inhibitory action of Ro on the HMG-CoA reductase enzyme. This inhibitory action of Ro on the main regulatory site of cholesterogenesis was not able to overthrow the effect of the cholesterol-rich diet on serum cholesterol levels.

The role of several molecules in inflammatory processes at mitochondrial level is already known. For instance, NF-Kβ plays a very important role in many mitochondria functions and it has been observed that its over-activation is related to inflammatory processes and cancer[43]. Furthermore, NF-Kβ is closely related to the functioning of antioxidant proteins expressed in mitochondria such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, which are important enzymes in the regulation of free radical genesis and proper functioning of mitochondrial energy m etabolism[44]. On the other hand, rosuvastatin has been reported to have beneficial cardioprotective effects in mice who received mild doses; in high doses however, this effect is lost and even harmful effects have

been observed[45].

Rosuvastatin is minimally metabolized through CYP 450 e nzymes[11]. An abnormal drug metabolism produces a large number of free radicals and lipid peroxidation resulting in oxidative stress and cells damage. In studies carried out in animal models, it was observed that the administration of statins in high doses for 8 weeks, decreased the activity of several enzymes related to oxidative stress (SOD, GHS and GR); therefore, a decrease in the activity of these enzymes could increase the production of free radicals. Besides, other additional mechanisms that may contribute to statin-induced oxidative stress have been observed: decreased activity of transporters (ABCB1 and ABCG2), activation of the caspase pathway, and decreased synthesis of coenzyme Q[[11,46]]. In this sense, Rosuvastatin reduces serum lipids and cholesterol, resulting in C oQ_{10} deficiency; C oQ_{10} is the antioxidant that can protect biological membranes from free radicals and lipid peroxidation, and C oQ_{10} deficiency might be traumatic after high doses of statins. In our study, a decrease in HDL-cholesterol was observed from day 3 of treatment with doses of 20 mg/kg/day; the dose-dependent effect of statins on LDL cholesterol reduction has previously been reported[47,48]. However, another study showed a low increase in HDL-C and a decrease in the capacity for cholesterol efflux by the ABCA1 protein after treatment with atorvastatin[49], which is important in the formation of HDL lipoproteins. Therefore, rosuvastatin in high doses could significantly affect the efflux of cholesterol by the ABCA1 protein and thus reduce the amount of HDL-C.

In electron microscopy, we observed rosette-shaped mitochondria, alterations in the inner membrane continuity and matrix with vacuous spaces. In light microscopy, hepatocytes with ballooning degeneration and cells with Mallory-Denk bodies were observed; from day 3 of treatment with HD + rosuvastatin at 20 mg/kg/day, these changes occurred in response to a severe depletion of ATP[50] and represent the macroscopic modifications that high doses of rosuvastatin have on mitochondrial metabolism.

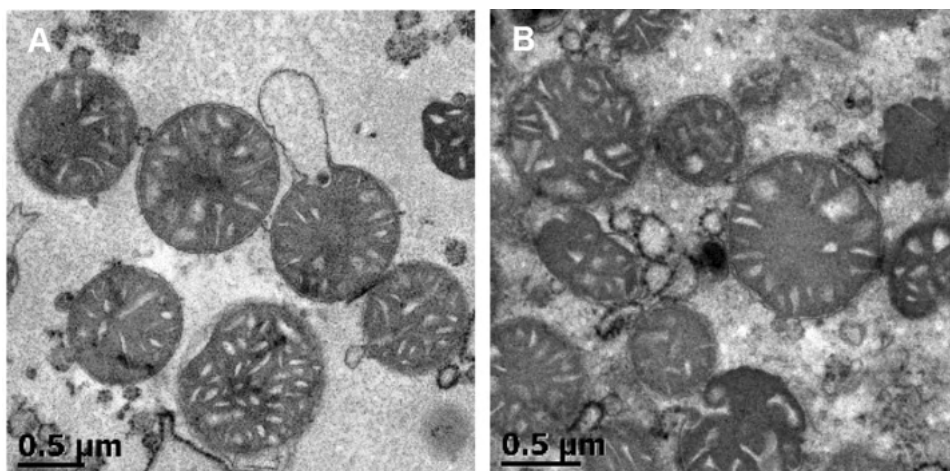
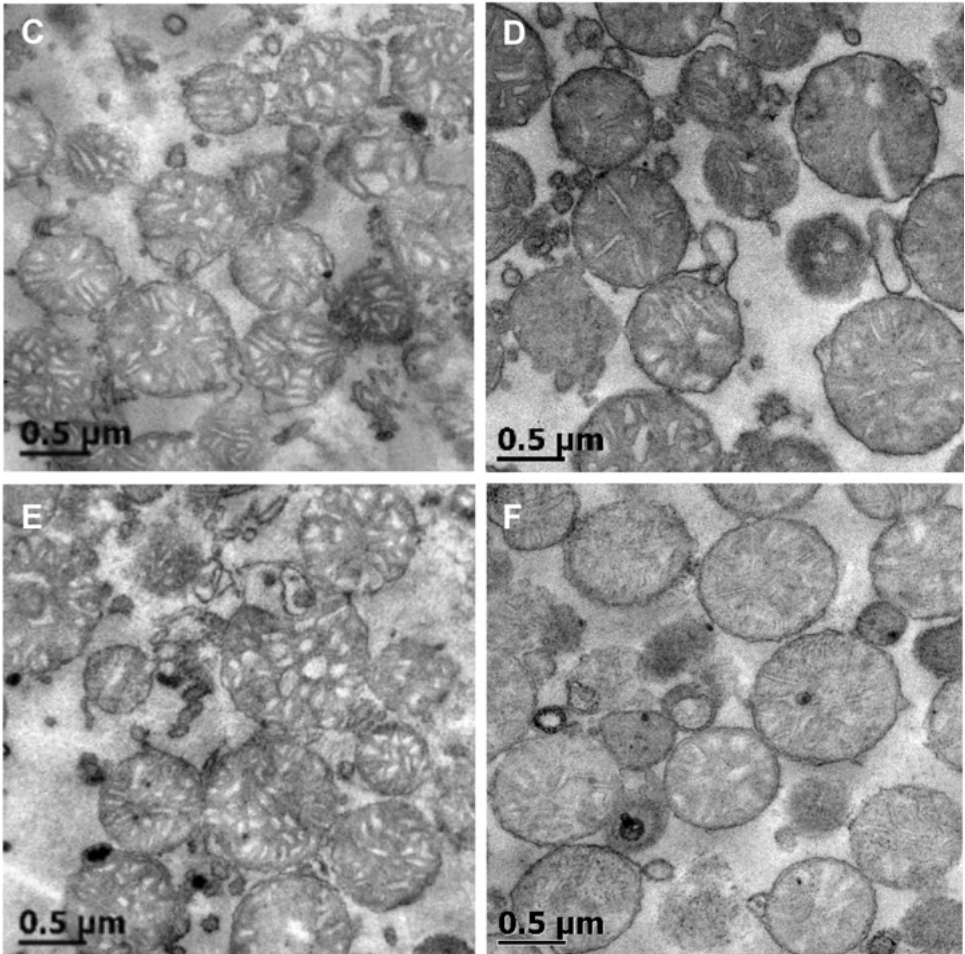



Figure 3. Electron microscopy of hepatocytes mitochondria from mice after cholesterol-rich diet and rosuvastatin. Liver mitochondria from male mice that were treated with (**A**) HD + Ro 5 mg/kg/day 11 days; (**B**) HD + Ro 2.5 mg/kg/day 5 days; (**C**) HD + Ro 1.0 mg/kg/day 59 days; (**D**) CD 59 days; (**E**) CD + Ro 1 mg/kg/day 59 days; (**F**) HD 59 days. CD, control diet; HD, cholesterol-rich diet; Ro, rosuvastatin.

CONCLUSION

HD + Ro in doses of 20 mg or higher produced premature death in our model; high rosuvastatin doses given to hypercholesterolemic mice produced severe changes in mitochondrial architecture and function, while low doses did not produce relevant changes in mitochondrial function or architecture. The combination of HD + Ro in our model increased the concentration of serum cholesterol and decreased that of HDL-C. More studies on mitochondrial alteration by the combination of rosuvastatin in a cholesterol-rich tissue are needed to translate these findings into humans.

STATEMENT OF METHODS

All methods were performed following the relevant guidelines and regulations established by the General Direction of Academic Matters (DGAPA-IN213718) of the "Universidad Nacional Autónoma de México".

STATEMENT AND ETHICAL CONSIDERATIONS OF EXPERIMENTAL PROTOCOLS IN ANIMAL MODELS

The animal study protocol was approved by the Research Committee for the Care and the Use of Laboratory Animals of the "Universidad Nacional Autónoma de México" (209-64).

STATEMENT OF STUDY

The present study was performed according to the ARRIVE guideline.

Received: 12 January 2021; Accepted: 15 July 2021

Published online: 04 August 2021.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by PAPIIT IN213718. The authors also thank Alejandra Gemila, Lourdes Palma and Hannah Groves for their assistance.

REFERENCES

1. Endo, A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* **33**, 1569–1582 (1992).

2. Adams, S. P., Sekhon, S. S. & Wright, J. M. Lipid-lowering efficacy of rosuvastatin. *Cochrane Database Syst. Rev.* **11**, CD010254. https:// doi. org/ 10. 1002/ 14651 858. CD010 254. pub2(2014) (2014).

3. Sniderman, A. D. *et al.* Apoprotein B particles and cardiovascular disease: A narrative review. *JAMA Cardiol.* **4**, 1289–1295. https:// doi. org/ 10. 1001/ jamac ardio. 2019. 3780 (2019).

4. Miyauchi, K. *et al.* Rationale and design of randomized evaluation of aggressive or moderate lipid lowering therapy with pitavastatin in coronary artery disease (REAL-CAD) trial. *Int. Heart J.* **59**, 315–320. https:// doi. org/ 10. 1536/ ihj. 17557 (2018).

5. Sparrow, R. T. *et al.* Effectiveness of interventions aimed at increasing statin-prescribing rates in primary cardiovascular disease prevention. A systematic review of randomized clinical trials. *JAMA Cardiol.* **4**, 1160–1169. https:// doi. org/ 10. 1001/ jamac ardio. 2019. 3066 (2019).

6. Stone, N. J. *et al.* American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**(25 Pt B), 2889–2934. https:// doi. org/ 10. 1016/j. jacc. 2013. 11. 002 (2014).

7. Mortensen, M. B. & Nordestgaard, B. G. Statin use in primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease according to 5 major guidelines for sensitivity, specificity, and number needed to treat. *JAMA Cardiol.* **4**, 1131–1138. https:// doi. org/ 10. 1001/ jamac ardio. 2019. 3665 (2019).

8. Soran, H., Shofield, J. D. & Durrington, P. N. Cholesterol, not just cardiovascular risk, is important in deciding who should receive statin treatment. *Eur. Heart J.* **36**, 2975–2983. https:// doi. org/ 10. 1093/ eurhe artj/ ehv340 (2016).

9. Rana, J. S. *et al.* Risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes and metabolic dyslipidemia without prevalent atherosclerotic cardiovascular disease. *Am. J. Med.* **133**, 200–206. https:// doi. org/ 10. 1016/j. amjmed. 2019. 07. 003 (2020).

10. Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Banjar, Z. M. & Kamal, H. K. M. Natural antihyperlipidemic agents: Current status and future perspectives. *Phytopharmacology* **4**, 492–531 (2013).

11. Liu, A. *et al.* Statins: Adverse reactions, oxidative stress and metabolic interactions. *Pharmacol. Ther.* **195**, 54–84. https:// doi. org/

10. 1016/j. pharm thera. 2018. 10. 004 (2019).

12. Thompson, P. D., Panza, G., Zaleski, A. & Taylor, B. Statin-associated side effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* **67**, 395–2410. https:// doi. org/ 10. 1016/j. jacc. 2016. 071 (2016).

13. Du Sovich, P., Roederer, G. & Dufour, R. Myotoxicity of statins: Mechanisms of action. *Pharmacol. Ther.* **175**, 1–16. https:// doi. org/ 10. 1016/j. pharm thera. 2017. 02. 029 (2017).

14. Needham, M. & Mastaglia, F. L. Statin myotoxicity: A review of genetic susceptibility factors. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 4–15. https:// doi. org/ 10. 1016/j. nmd. 2013. 09. 011 (2014).

15. Knuuttila, E., Riikonen, J., Syvala, H., Auriola, S. & Murtola, T. Access and concentrations of atorvastatin in the prostate in men with prostate cancer. *Prostate* **79**, 1412–1419. https:// doi. org/ 10. 1002/ pros. 23863 (2019).

16. Singh, V., Tiwari, R. L., Dikshit, M. & Barthwal, M. K. Models to study atherosclerosis: A mechanistic insight. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**, 75–109. https:// doi. org/ 10. 2174/ 15701 61097 87354 097 (2009).

17. Kornbrust, D. J. *et al.* Toxicity of the HMG-coenzyme A reductase inhibitor, lovastatin, to rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**, 498–505 (1989).

18. Asenjo-Barrón, J. C. *et al.* High lovastatin doses combined with hypercholesterolemic diet induce hepatic damage and are lethal to the CD-1 mouse. *Life Sci.* **64**, 2155–2161. https:// doi. org/ 10. 1016/ s0024- 3205(99) 00162- 92 (1999).

19. Díaz-Zagoya, J. C. *et al.* Comparative toxicity of high doses of vastatins currently used by clinicians, in CD-1 male mice fed with a hypercholesterolemic diet. *Life Sci.* **65**, 947–956. https:// doi. org/ 10. 1016/ s0024- 3205(99) 00324-0 (1999).

20. Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **19**, 117–125. https:// doi. org/ 10. 1111/j. 1472- 8206. 2004. 00299.x (2005).

21. Miyasaka, K. *et al.* Susceptibility to obesity and gallbladder stasis produced by a protein- and fat-enriched diet in male mice compared with female mice. *Nutr. Metab. (Lond.)* **4**, 14. https:// doi. org/ 10. 1186/ 1743- 7075-4- 14 (2007).

22. Frezza, C., Cipolat, S. & Scorrano, L. Organelle isolation: Functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* **2**, 287–295. https:// doi. org/ 10. 1038/ nprot. 2006. 478 (2007).

23. Bradford, M. M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254. https:// doi. org/ 10. 1006/ abio. 1976. 9999 (1976).

24. Chance, B. & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J. Biol. Chem.* **217**, 409–427 (1955).

25. Rao, A. & Ramakrishnan, S. Indirect assessment of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity in liver tissue. *Clin. Chem.* **21**, 1523–1525 (1975).

26. Ahmed, T. A. *et al.* Rosuvastatin lyophilized tablets loaded with flexible chitosomes for improved drug bioavailability, antihyperlipidemic and anti-oxidant activity. *Int. J. Pharm.* **588**, 119791. https:// doi. org/ 10. 1016/j. ijpha rm. 2020. 119791 (2020).

27. Madison, B. B. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J. Lipid Res.* **3**, 333–335. https:// doi. org/ 10. 1194/ jlr. C0667 12 (2016).

28. Yu, P. *et al.* Rosuvastatin reduces aortic sinus and coronary artery atherosclerosis in SR-B1 (Scavenger Receptor Class B Type 1)/ ApoE (Apolipoprotein E) double knockout mice independently of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **38**, 26–39. https:// doi. org/ 10. 1161/ ATVBA HA. 117. 305140 (2018).

29. Truwit, J. D. *et al.* National heart, lung, and blood institute ARDS clinical trials network, rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* **370**, 2191–2200. https:// doi. org/ 10. 1056/ NEJMo a1401 520 (2014).

30. Doumas, M. *et al.* The role of statins in the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 4587–4592. https:// doi. org/ 10. 2174/ 13816 12825 66619 01171 14305 (2018).

31. Finkler, J. M. G., Carvalho, S. C., Santo-Neto, H. & Marques, M. J. Cardiac and skeletal muscle changes associated with rosuvastatin therapy in dystrophic mdx mice. *Anat. Rec. (Hoboken)* **303**, 2202–2212. https:// doi. org/ 10. 1002/ ar. 24341 (2020).

32. Falcone, D. *et al.* Effects of simvastatin and rosuvastatin on RAS protein, matrix metalloproteinases and NF-κB in lung cancer and in normal pulmonary tissues. *Cell Prolif.* **46**, 172–182. https:// doi. org/ 10. 1111/ cpr. 12018 (2013).

33. Ibraheem, H. *et al.* Rosuvastatin attenuates high-salt and cholesterol diet induced neuroinflammation and cognitive impairment via preventing nuclear factor KappaB pathway. *Neurochem. Res.* **42**, 2404–2416. https://d oi.org/1 0 .1007 /s 1164-017-2 264- 2 (2017).

34. Lima Martínez, M. M., Contreras, M. A., Marín, W. & D'Marco, L. Statins in COVID-19: Is there any foundation?. *Clin. Investig. Arterioscler.* **32**, 278–281. https:// doi. org/ 10. 1016/j. arteri. 2020. 06. 003 (2020).

35. Radenkovic, D., Chawla, S., Pirro, M., Sahebkar, A. & Banach, M. Cholesterol in relation to COVID-19: Should we care about it?.

J. Clin. Med. **9**, 1909. https:// doi. org/ 10. 3390/ jcm90 61909. 29 (2020).

36. Kow, C. S. & Hasan, S. S. Meta-analysis of effect of statins in patients with COVID-19. *Am. J. Cardiol.* **134**, 153–155. https:// doi. org/ 10. 1016/j. amjca rd. 2020. 08. 004 (2020).

37. Vevera, J. *et al.* Statin-induced changes in mitochondrial respiration in blood platelets in rats and human with dyslipidemia. *Physiol. Res.* **65**, 777–788. https:// doi. org/ 10. 33549/ physi olres. 933264 (2016).

38. Argaud, L. *et al.* Preconditioning delays Ca^{2+}-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc. Res.* **61**, 115–122. https:// doi. org/ 10. 1016/j. cardi ores. 2003. 11. 003 (2004).

39. Rosca, M. G. *et al.* Altered expression of the adenine nucleotide translocase isoforms and decreased ATP synthase activity in skeletal muscle mitochondria in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **46**, 927–935. https:// doi. org/ 10. 1016/j. yjmcc. 2009. 02. 009 (2009).

40. Gvozdjáková, A. *et al.* Statin-induced mitochondrial dysfunction and targeting coenzyme Q_{10} therapy. *World Heart J.* **8**, 171 (2016).

41. Dohlmann, T. L. *et al.* Statin treatment decreases mitochondrial respiration but muscle coenzyme Q10 levels are unaltered: the LIFESTAT study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**, 2501–2508. https:// doi. org/ 10. 1210/ jc. 2018- 01185 (2019).

42. Heine, K. B. & Hood, W. R. Mitochondrial behavior, morphology, and animal performance. *Biol. Rev.* **95**, 730–737. https:// doi. org/ 10. 1111/ brv. 12584 (2020).

43. Sepuri, N. B. V., Tammineni, P., Mohammed, F. & Paripati, A. Nuclear transcription factors in the mitochondria: A new paradigm in fine-tuning mitochondrial metabolism. *Handb. Exp. Pharmacol.* **240**, 3–20. https:// doi. org/ 10. 1007/ 164_ 2016_3 (2017).

44. Guo, G. *et al.* Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 2362–2378. https:// doi. org/ 10. 1128/ mcb. 23.7. 2362- 2378. 2003 (2003).

45. Liu, C. W. *et al.* Rosuvastatin postconditioning protects isolated heart against ischemic-reperfusion injury: The role of radical oxygen species, PI3K-Akt-GSK-3β pathway and mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc. Ther.* **35**, 3–9. https:// doi. org/ 10. 1111/ 1755- 5922. 12225 (2017).

46. Farag, M. M., Mohamed, M. B. & Youssef, E. A. Assessment of hepatic function, oxidant/antioxidant status, and histopathological changes in rats treated with atorvastatin: Effect of dose and acute intoxication with acetaminophen. *Hum. Exp. Toxicol.* **34**, 828–837. https:// doi. org/ 10. 1177/ 09603 27114 559991 (2015).

47. Oesterle, A., Laufs, U., & Liao, J. K. Pleiotropic effects of statins on the cardiovascular system. *Circ. Res.* **120**, 229–243 https:// doi. org/ 10. 1161/ CIRCR ESAHA. 116. 308537 (2017).

48. Pincus, J. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am. J. Cardiol.* **82**, 406–407 (1998).

49. Ronsein, G. E. *et al.* Niacin therapy increases high-density lipoprotein particles and total cholesterol efflux capacity but not ABCA1specific cholesterol efflux in statin-treated subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **36**, 404–411. https://d oi.org/1 0 .1161 /A TVBA HA. 115. 306268 (2016).

50. French, S. W., Bardag-Gorce, F., Li, J., French, B. A. & Oliva, J. Mallory–Denk body pathogenesis revisited. *World J. Hepatol.* **2**, 295–301. https:// doi. org/ 10. 4254/ wjh. v2. i8. 295 (2010).

SOBRE A ORGANIZADORA

DANIELA REIS JOAQUIM DE FREITAS - Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2000), com mestrado em Biologia Celular e Molecular (2002), doutorado em Ciências (2006) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado e o doutorado trabalhou diretamente com biologia celular e molecular e bioquímica, na clonagem e expressão de genes do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Também trabalhou com morte celular e estresse oxidativo no carrapato. Fez pós-doutorado na área de Ciências Médicas - Farmacologia (2007) na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Atualmente é professora e líder do Grupo de Estudos em Microbiologia e Parasitologia (NUEMP) no Departamento de Parasitologia e Microbiologia, e membro do Núcleo de Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecções em Serviços de Saúde (NUPCISS) na Universidade Federal do Piauí. Também é docente permanente do Programa de Pós-Graduação em Enfermagem (PPGEnf-UFPI). Tem experiência nas áreas de Biologia Celular e Molecular, Imunologia, Parasitologia, Microbiologia e Farmacologia Experimental e tem linhas de pesquisa em Controle de Infecções em Serviços de Saúde, Infecções comunitárias e Educação em Saúde.

ÍNDICE REMISSIVO

A

B

C

D

E

F

G

H

M

N

P

R

S

T

U

V

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br
@atenaeditora
www.facebook.com/atenaeditora.com.br

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA EN

CIENCIAS BIOLÓGICAS

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br

@atenaeditora

www.facebook.com/atenaeditora.com.br

Ano 2022